

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 41 382.7

Anmeldetag: 31. August 1999

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,
Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Codierende Gene von Corynebacterium
Glutamicum für an der gentischen Stabi-
lität, Genexpression und der Proteinsekre-
tion und -faltung beteiligte Proteine

IPC: C 07 K, C 07 H, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

BEST AVAILABLE COPY

Hiebinger

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutami-*
5 *cum*, das ein SES-Protein oder einen Abschnitt davon codiert.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nu-
kleinsäuremolekül ein SES-Protein codiert, das an der Produk-
tion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
- 10 3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutami-*
cum, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A
aufgeführten Sequenzen, oder einem Abschnitt davon.
- 15 4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Polypeptidsequenz
codiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in An-
hang B angegebenen Sequenzen.
- 20 5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine natürlich vorkom-
mende allelische Variante eines Polypeptides codiert, ausge-
wählt aus der Gruppe von Aminosäuresequenzen, bestehend aus
den in Anhang B aufgeführten Sequenzen.
- 25 6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidse-
quenz, die zu mindestens 50% zu einer Nukleotidsequenz, aus-
gewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angege-
benen Sequenzen, oder einem Abschnitt davon homolog ist.
- 30 7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend ein Fragment mit
mindestens 15 Nukleotiden einer Nukleinsäure, umfassend eine
Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus
den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
- 35 8. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedin-
gungen an ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche
1-7 hybridisiert.
- 40 9. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend das Nukleinsäuremo-
lekül nach einem der Ansprüche 1-8 oder einen Abschnitt davon
und eine Nukleotidsequenz, die ein heterologes Polypeptid co-
diert.

2

10. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-9.
11. Vektor nach Anspruch 10, welcher ein Expressionsvektor ist.
- 5 12. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 11 transfiziert ist.
- 10 13. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Zelle ein Mikroorganismus ist.
14. Wirtszelle nach Anspruch 13, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
- 15 15. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls eine Modulation der Produktion einer Feinchemikalie von der Zelle bewirkt.
- 20 16. Wirtszelle nach Anspruch 15, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.
- 25 17. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 12 in einem geeigneten Kulturmedium, um so das Polypeptid zu produzieren.
- 30 18. Isoliertes SES-Polypeptid aus *Corynebacterium glutamicum* oder ein Abschnitt davon.
19. Polypeptid nach Anspruch 18, wobei das Polypeptid an der Produktion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
- 35 20. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 40 21. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine natürlich vorkommende allelische Variante eines Polypeptides, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen, oder einen Abschnitt davon.
- 45 22. Isoliertes Polypeptid nach einem der Ansprüche 18-21, das zudem heterologe Aminosäuresequenzen umfaßt.

3

23. Isoliertes Polypeptid, das von einem Nukleinsäuremolekül codiert wird, umfassend eine Nukleotidsequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Nukleinsäure ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
- 5 24. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 10 25. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das Züchten einer Zelle, die einen Vektor nach Anspruch 12 enthält, so daß die Feinchemikalie produziert wird.
- 15 26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Gewinnen der Feinchemikalie aus der Kultur umfaßt.
- 20 27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Transfizieren der Zelle mit dem Vektor nach Anspruch 11 umfaßt, so daß eine Zelle erhalten wird, die den Vektor enthält.
- 25 28. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
- 30 29. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium fujiokense*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium butanicum*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium healii*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium ketosoreductum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium paraffinolyticum* und den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen.
- 35 30. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls von dem Vektor die Modulation der Produktion der Feinchemikalie bewirkt.
- 40
- 45

4

31. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.
32. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie eine Aminosäure ist.
33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Aminosäure aus der Gruppe stammt, bestehend aus: Lysin, Glutamat, Glutamin, Alanin, Aspartat, Glycin, Serin, Threonin, Methionin, Cystein, Valin, Leucin, Isoleucin, Arginin, Prolin, Histidin, Tyrosin; Phenylalanin und Tryptophan.
34. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das Züchten einer Zelle, deren genomische DNA durch Einschluß eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1-9 verändert worden ist.

CODIERENDE GENE VON *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* FÜR AN DER
GENTISCHEN STABILITÄT, GENEXPRESSION UND DER PROTEINSEKRETION
UND -FALTUNG BETEILIGTE PROTEINE

5

Hintergrund der Erfindung

- Bestimmte Produkte und Nebenprodukte von natürlich vorkommenden Stoffwechselprozessen in Zellen werden in vielen Industriezweigen
- 10 verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Moleküle, die gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren,
- 15 Dirole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Co-faktoren sowie Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am besten mittels Anzucht von Bakterien im Großmaßstab, die entwickelt wurden, um große Mengen des jeweils gewünschten Moleküls zu produzieren und sezernieren. Ein für diesen Zweck besonders geeigneter Organismus
- 20 ist *Corynebacterium glutamicum*, ein gram-positives, nicht-pathogenes Bakterium. Über Stammselektion ist eine Reihe von Mutantstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen produzieren. Die Auswahl von Stämmen, die hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls verbessert sind, ist je-
- 25 doch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren.

Zusammenfassung der Erfindung

- Diese Erfindung stellt neuartige Nukleinsäuremoleküle bereit, die
- 30 sich zur Identifizierung oder Klassifizierung von *Corynebacterium glutamicum* oder verwandten Bakterienarten verwenden lassen. *C. glutamicum* ist ein gram-positives, aerobes Bakterium, das gewöhnlich in der Industrie für die Produktion im Großmaßstab einer Reihe von Feinchemikalien und auch zum Abbau von Kohlenwasser-
- 35 stoffen (bspw. beim Überlaufen von Rohöl) und zur Oxidation von Terpenoiden gemeinhin verwendet wird. Die Nukleinsäuremoleküle können daher zum Identifizieren von Mikroorganismen eingesetzt werden, die sich zur Produktion von Feinchemikalien, bspw. durch Fermentationsverfahren, verwenden lassen. *C. glutamicum* selbst
- 40 ist zwar nicht-pathogen, jedoch ist es mit anderen *Corynebacterium*-Arten, wie *Corynebacterium diphtheriae* (dem Erreger der Diphtherie) verwandt, die bedeutende Pathogene beim Menschen sind. Die Fähigkeit, das Vorhandensein von *Corynebacterium*-Arten zu identifizieren, kann daher auch eine signifikante klinische Be-
- 45 deutung haben, z.B. bei diagnostischen Anwendungen. Diese Nukleinsäuremoleküle können zudem als Bezugspunkte zur Kartierung

2

des *C. glutamicum*-Genoms oder von Genomen verwandter Organismen dienen.

- Diese neuen Nukleinsäuremoleküle codieren Proteine, die hier als
- 5 Genstabilitäts-, Genexpressions- oder Proteinsekretions-/Faltungs- (SES-) Proteine bezeichnet werden. Diese SES-Proteine können bspw. eine an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Expression von Genen (d. h. die an der Transkription oder Translation beteiligt sind), Protein-
- 10 faltung oder Proteinsekretion in *C. glutamicum* beteiligte Funktion ausüben. Aufgrund der Verfügbarkeit von in *Corynebacterium glutamicum* verwendbaren Klonierungsvektoren, wie bspw. offenbart in Sinskey et al., US-Patent Nr. 4 649 119, und von Techniken zur genetischen Manipulation von *C. glutamicum* und den verwandten
- 15 *Brevibacterium*-Arten (z.B. *lactofermentum*) (Yoshihama et al., J. Bacteriol. 162:591-597 (1985); Katsumata et al., J. Bacteriol. 159:306-311 (1984); und Santamaria et al. J. Gen. Microbiol. 130:2237-2246 (1984)), lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur genetischen Manipulation dieses Organismus ver-
- 20 wenden, damit er ein effizienterer Produzent einer oder mehrerer Feinchemikalien wird. Diese verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann aufgrund einer direkten Auswirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder aufgrund einer indirekten Auswirkung einer solchen Manipulation
- 25 erfolgen.

- Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen SES-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C.*
- 30 *glutamicum*-Stamm, der dieses veränderte Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Zum Beispiel sollte die Modulation von Proteinen, die direkt an der Transkription oder Translation beteiligt sind (z.B. Polymerasen oder Ribosomen), so daß ihre Anzahl oder Aktivität gesteigert wird, die zelluläre Transkription oder
- 35 Translation (oder die Geschwindigkeiten dieser Prozesse) insgesamt steigern. Diese erhöhte zelluläre Genexpression sollte solche Proteine umfassen, die an der Feinchemikalienbiosynthese beteiligt sind, so daß eine Steigerung der Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer gewünschten
- 40 Verbindungen erfolgen kann. Modifikationen der Transkriptions-/Translations-Proteinmaschinerie von *C. glutamicum*, so daß die Regulation dieser Proteine verändert wird, kann auch die erhöhte Expression von Genen, die an der Produktion von Feinchemikalien beteiligt sind, ermöglichen. Die Modulation der Aktivität
- 45 einer Reihe von Proteinen, die an der Peptidfaltung beteiligt sind, kann eine Erhöhung der Gesamtproduktion korrekt gefalteter Moleküle in der Zelle ermöglichen, wodurch die Möglichkeit erhöht

3

wird, daß gewünschte Proteine (z.B. Feinchemikalienbiosynthese-Proteine) richtig funktionieren. Ferner kann es durch Mutation von an der Sekretion aus *C. glutamicum* beteiligten Proteinen, so daß ihre Anzahl oder Aktivität erhöht ist, möglich sein, die Sekretion einer Feinchemikalie (z.B. eines Enzyms) aus Zellen in der Fermentationskultur zu erhöhen, aus der sie leicht gewonnen werden kann.

Die genetische Modifikation der erfindungsgemäßen SES-Moleküle kann auch zu einer indirekten Modulation der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien führen. Beispielsweise kann man durch Erhöhen der Anzahl oder Aktivität eines erfindungsgemäßen DNA-Reparatur- oder -Rekombinationsproteins die Fähigkeit der Zelle, eine DNA-Schädigung zu entdecken und zu reparieren, erhöhen. Dies sollte die Fähigkeit der Zelle, ein mutiertes Gen in ihrem Genom zu halten, wirksam erhöhen und dadurch die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß ein gentechnologisch in *C. glutamicum* eingebrachtes Transgen (das z.B. ein Protein codiert, das die Biosynthese einer Feinchemikalie steigert) nicht während der Züchtung des Mikroorganismus verloren geht. Dagegen kann es durch Verringern der Anzahl oder Aktivität eines oder mehrerer DNA-Reparatur- oder -Rekombinationsproteine möglich sein, die genetische Instabilität des Organismus zu steigern. Diese Manipulationen sollten die Fähigkeit des Organismus, durch Mutagenese modifiziert zu werden, verbessern, ohne daß die eingebrachte Mutation berichtigt wird. Das gleiche gilt für Proteine, die an der Transposition oder Umlagerung genetischer Elemente in *C. glutamicum* beteiligt sind (z.B. Transposons). Durch Mutagenese dieser Proteine, so daß ihre Anzahl oder Aktivität entweder gesteigert oder verringert wird, ist es möglich, gleichzeitig die genetische Stabilität des Mikroorganismus zu steigern oder zu verringern. Dies hat eine bedeutende Auswirkung darauf, daß eine andere Mutation in *C. glutamicum* eingebracht und die eingebrachte Mutation beibehalten werden kann. Transposons bieten ebenfalls einen geeigneten Mechanismus, durch den die Mutagenese von *C. glutamicum* durchgeführt werden kann; die Duplikation gewünschter Gene (z.B. von Feinchemikalienbiosynthese-Genen) läßt sich leicht mittels Transposonmutagenese durchführen, wie auch die Disruption unerwünschter Gene (z.B. Gene, die am Abbau gewünschter Feinchemikalien beteiligt sind).

Durch die Modulation eines oder mehrerer Proteine (z.B. Sigma-Faktoren), die an der Regulation der Transkription oder Translation in Reaktion auf besondere Umweltbedingungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Zelle daran zu hindern, daß sie die Proteinsynthese unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie man sie in einer Fermenterkultur im Großmaßstab antrifft, verlangsamt

- oder beendet. Dies sollte zu erhöhter Genexpression führen, was wiederum die gesteigerte Biosynthese gewünschter Feinchemikalien unter diesen Bedingungen ermöglichen kann. Die Mutagenese von an Sekretionssystemen beteiligten Proteinen kann zu modulierten
- 5 Sekretionsraten führen. Viele dieser sezernierten Proteine haben Funktionen, die für die Zellebensfähigkeit wichtig sind (z.B. Zelloberflächenproteasen oder -Rezeptoren). Eine Änderung des Sekretionswegs, so daß diese Proteine leichter an ihren extrazellulären Ort transportiert werden, kann die Gesamtlebensfähigkeit
- 10 der Zelle erhöhen und somit zu höheren Zahlen an *C. glutamicum*-Zellen führen, die Feinchemikalien während eine Züchtung im Großmaßstab produzieren können. Ferner ist der Sekretionsapparat (z.B. das sec-System) bekanntlich auch an der Insertion von integralen Membranproteinen (z.B. Poren, Kanälen oder Transportern)
- 15 in die Membran beteiligt. So kann die Modulation der Aktivität von Proteinen, die an der Proteinsekretion aus *C. glutamicum* beteiligt sind, die Fähigkeit der Zelle zur Ausscheidung von Abfallprodukten oder zum Import notwendiger Metabolite beeinflussen. Ist die Aktivität dieser sekretorischen Proteine erhöht,
- 20 kann ebenfalls die Fähigkeit der Zelle zur Produktion von Feinchemikalien erhöht sein. Ist die Aktivität dieser sekretorischen Proteine verringert, können nicht genügend Nährstoffe zur Unterstützung der Überproduktion gewünschter Verbindungen vorhanden sein, oder Abfallprodukte können diese Biosynthese stören.
- 25 Die Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die Proteine codieren, die hier als SES-Proteine bezeichnet werden und bspw an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Expression von Genen (d. h. den Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* beteiligt sein können. Nukleinsäuremoleküle, die ein SES-Protein codieren, werden hier als SES-Nukleinsäuremoleküle bezeichnet. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist ein SES-Protein an der Verbesserung oder
- 35 Verringerung der genetischen Stabilität in *C. glutamicum*, der Expression von Genen (z.B. bei der Transkription oder Translation) oder der Proteinfaltung in diesem Organismus oder an der Proteinsekretion aus *C. glutamicum* beteiligt. Beispiele für solche Proteine sind diejenigen, die von den in Tabelle 1 angegebenen Genen
- 40 codiert werden.

- Ein Aspekt der Erfindung betrifft folglich isolierte Nukleinsäuremoleküle (bspw. cDNAs), umfassend eine Nukleotidsequenz, die ein SES-Protein oder biologisch aktive Abschnitte davon codiert,
- 45 sowie Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisierungs sonden zum Nachweis oder zur Amplifikation von SES-codierenden Nukleinsäure (bspw. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders be-

5

vorzugten Ausführungsformen umfaßt das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen oder den codierenden Bereich einer dieser Nukleotidsequenzen oder ein Komplement davon. In anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine in Anhang A angegebene Nukleotidsequenz hybridisiert oder mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer dazu ist, oder einen Abschnitt davon. In anderen bevorzugten Ausführungsformen codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang B aufgeführten Aminosäuresequenzen. Die bevorzugten erfindungsgemäßen SES-Proteine besitzen ebenfalls vorzugsweise mindestens eine der hier beschriebenen SES-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform codiert das isolierte Nukleinsäuremoleküle ein Protein oder einen Abschnitt davon, wobei das Protein oder sein Abschnitt eine Aminosäuresequenz enthält, die zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B hinreichend homolog ist, bspw. zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B derart hinreichend homolog ist, daß das Protein oder sein Abschnitt eine SES-Aktivität behält. Vorzugsweise behält das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein oder der Abschnitt davon die Fähigkeit, an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilzunehmen. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch homologer zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B (bspw. einer vollständigen Aminosäuresequenz, ausgewählt aus den in Anhang B genannten Sequenzen). Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B (die von einem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster codiert wird) im wesentlichen homolog ist.

40

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt das isolierte Nukleinsäuremolekül aus *C. glutamicum* und codiert ein Protein (z.B. ein SES-Fusionsprotein), das eine biologisch aktive Domäne umfaßt, die zu einer der Aminosäuresequenzen in Anhang B zumindest zu etwa 50% oder stärker homolog ist und an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translations-

6

prozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 beschriebenen Aktivitäten besitzt und auch heterologe Nukleinsäuresequenzen enthält, die ein heterologes Polypeptid oder
5 regulatorische Bereiche codieren.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. Das isolierte Nukleinsäuremolekül entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Die isolierte Nukleinsäure codiert stärker bevorzugt ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-SES-Protein oder einen biologisch aktiven Abschnitt davon.

15

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, bspw. rekombinante Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind. Bei einer Ausführungsform wird
20 diese Wirtszelle zur Herstellung eines SES-Proteins verwendet, indem die Wirtszelle in einem geeigneten Medium gezüchtet wird. Das SES-Protein kann dann aus dem Medium oder der Wirtszelle isoliert werden.

25 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen genetisch veränderten Mikroorganismus, bei dem ein SES-Gen eingebracht oder verändert worden ist. Das Genom des Mikroorganismus ist bei einer Ausführungsform durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls verändert worden, das die SES-Wildtyp- oder die mutierte SES-Sequenz als Transgen codiert. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes SES-Gen im Genom des Mikroorganismus durch homologe Rekombination mit einem veränderten SES-Gen verändert, z.B. funktionell disrupiert, worden. Der Mikroorganismus gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung
30 *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, wobei *Corynebacterium glutamicum* besonders bevorzugt ist. Der Mikroorganismus wird in einer bevorzugten Ausführungsform auch zur Herstellung einer gewünschten Verbindung, wie einer Aminosäure, verwendet, wobei Lysin besonders bevorzugt ist.

40

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes SES-Protein oder einen Abschnitt, bspw. einen biologisch aktiven Abschnitt, davon. Das isolierte SES-Protein oder sein Abschnitt kann in einer bevorzugten Ausführungsform an der Reparatur oder
45 Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutami-*

7

- cum teilnehmen. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das isolierte SES-Protein oder ein Abschnitt davon hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B, so daß das Protein oder sein Abschnitt die Fähigkeit behält, bspw. an der
- 5 Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilzunehmen.
- 10 Die Erfindung stellt zudem ein isoliertes SES-Proteinpräparat bereit. Das SES-Protein umfaßt bei bevorzugten Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz aus Anhang B. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Vollängenprotein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus An-
- 15 hang B (welche von einem offenen Leseraster in Anhang A codiert wird) im wesentlichen homolog ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%,
- 20 97%, 98%, oder 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B. Das isolierte SES-Protein umfaßt bei anderen Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50% oder stärker zu einer der Aminosäuresequenzen aus Anhang B homolog ist und an der Reparatur oder Rekombination
- 25 von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d.h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 beschriebenen Aktivitäten hat.
- 30 Das isolierte SES-Protein kann alternativ eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, welche mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang B, bspw. unter stringenten Bedingungen, hybridisiert oder mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise
- 35 mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch homologer dazu ist. Bevorzugte Formen der SES-Proteine haben ebenfalls vorzugsweise eine oder mehrere der hier beschriebenen biologischen Aktivitäten von SES.
- 40 Das SES-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon kann mit einem Nicht-SES-Polypeptid funktionsfähig verbunden werden, damit ein Fusionsprotein entsteht. Dieses Fusionsprotein hat bei bevorzugten Ausführungsformen eine andere Aktivität als das
- 45 SES-Protein allein. Bei anderen bevorzugten Ausführungsformen nimmt dieses Fusionsprotein an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression

8

(d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teil. Die Integration dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle moduliert bei besonders bevorzugten Ausführungsformen die Produktion
5 einer gewünschten Verbindung von der Zelle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie. Das Verfahren sieht die Anzucht einer Zelle vor, die einen Vektor enthält, der die Expression eines erfindungsgemäßen SES-Nukleinsäuremoleküls bewirkt, so daß
10 eine Feinchemikalie produziert wird. Dieses Verfahren umfaßt bei einer bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt der Gewinnung einer Zelle, die einen solchen Vektor enthält, wobei die Zelle mit einem Vektor transfiziert ist, der die Expression einer SES-Nukleinsäure bewirkt. Dieses Verfahren umfaßt bei einer weiteren
15 bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt, bei dem die Feinchemikalie aus der Kultur gewonnen wird. Die Zelle gehört bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* oder ist aus den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen ausgewählt.
20

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls von einem Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer
25 Substanz, die die SES-Proteinaktivität oder die SES-Nukleinsäure-Expression moduliert, so daß eine zellassoziierte Aktivität verglichen mit der gleichen Aktivität bei Fehlen der Substanz verändert wird. Die Zelle wird bei einer bevorzugten Ausführungsform hinsichtlich einer oder mehrerer *C. glutamicum*-Prozesse moduliert, die an der genetischen Stabilität, Genexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion beteiligt sind, so daß die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalien durch diesen Mikroorganismus verbessert wird. Die Substanz, die die SES-Proteinaktivität moduliert, kann eine Substanz sein, die die SES-Proteinaktivität oder die SES-Nukleinsäure-Expression stimuliert. Beispiele für Substanzen, die die SES-Proteinaktivität oder SES-Nukleinsäureexpression stimulieren, umfassen kleine Moleküle, aktive SES-Proteine und Nukleinsäuren, die SES-Proteine codieren und in die Zelle eingebracht worden
35 sind. Beispiele für Substanzen, die die SES-Aktivität oder -Expression hemmen, umfassen kleine Moleküle und SES-Antisense-Nukleinsäuremoleküle.
40

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung von einer Zelle, umfassend das Einbringen eines SES-Wildtyp- oder -Mutantengens in eine Zelle, das entweder auf einem gesonderten Plasmid bleibt
45

oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Die Integration in das Genom kann zufallsgemäß oder durch homologe Rekombination erfolgen, so daß das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, was die Produktion der gewünschten Verbindung von der zu modulierenden Zelle hervorruft. Diese Ausbeuten sind bei einer bevorzugten Ausführungsform erhöht. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Chemikalie eine Feinchemikalie, die in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine Aminosäure ist. Diese Aminosäure ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform L-Lysin.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung stellt SES-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bereit, die an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* beteiligt sind. Die erfindungsgemäßen Moleküle können zur Modulation der Produktion von Feinchemikalien von Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, entweder direkt (z.B. wenn die Überexpression oder Optimierung der Aktivität eines an der Sekretion einer Feinchemikalie beteiligten Proteins (z.B. eines Enzyms) eine direkte Auswirkung auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie von den modifizierten *C. glutamicum* hat) oder durch indirekte Auswirkung verwendet werden, die dennoch zu einer Erhöhung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der gewünschten Verbindung führt, (z.B. wenn die Modulation der Aktivität oder Kopienzahl eines *C. glutamicum*-DNA-Reparaturproteins zu Änderungen in der Fähigkeit des Mikroorganismus, die eingebrachte Mutation aufrechtzuerhalten, was wiederum die Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien von diesem Stamm beeinflussen kann). Die Aspekte der Erfindung sind nachstehend weiter erläutert.

35

I. Feinchemikalien

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts- und Kosmetikindustrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al.,

- Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlehydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCs Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

A. *Metabolismus und Verwendungen von Aminosäuren*

- Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen in allen Organismen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der optischen D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosynthese- und Abbauewege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L., Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, weil sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthesen gewöhnlich mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der

11

Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind
5 diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat
entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nah-
rungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und
pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht
10 nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, son-
dern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine.
Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatrium-
glutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie ver-
wendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Gly-
15 cin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeu-
tischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin,
Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharma-
zeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threo-
nin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futter-
mittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical
20 production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechno-
logy Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß
sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese
von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein,
S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen in
25 Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97,
VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die
sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert
30 worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynt-
hese und ihrer Regulation s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Bio-
chem. 47:533-606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von
 α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus,
synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nach-
35 einander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt
in einem Dreischritt-Verfahren, beginnt mit 3-Phosphoglycerat
(einem Zwischenprodukt der Glykolyse) und ergibt nach Oxida-
tions-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Amino-
säure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert,
40 und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Se-
rin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlen-
stoffatoms auf Tetrahydrofolat in einer durch Serin-Transhydroxy-
methylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden
aus den Vorstufen des Glykolyse- und Pentosephosphatweges, Eryt-
45 hrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat, in einem 9-Schritt-Bio-
syntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden
Schritten nach der Synthese von Präphenat unterscheidet. Trypto-

12

phan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden statt dessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über Rückkopplungs-Mechanismen bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

B. *Metabolismus und Verwendungen von Vitaminen, Cofaktoren und Nutrazeutika*

Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenüberträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungshilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins",

13

- Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können.
- 5 Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind
- 10 vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).
- 15 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G.
- 20 (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free
- 25 Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).
- Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus
- 30 Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat
- 35 und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothenensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten
- 40 Schritte bei der Panthothenat-Biosynthese bestehen aus der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothenensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthothenat
- 45 ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht

14

nur die Bildung von Pantothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- 5 Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören.
- 10 ren. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoessäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist.
- 15 Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-Aminobenzoessäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.
- 20 Corrinioide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der beteiligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.
- 30

- Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin, auch durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.
- 35

40

C. *Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen*

- Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteile der Nu-
- 45

15

kleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisierung zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei Krebszellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikationsfähigkeit von Tumorzellen hemmen. Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10:505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressiva oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. (1995) "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5:752-757; (1995) Biochem. Soc. Transact. 23:877-902). Die Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, die gewöhnlich als Geschmacksverstärker (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen verwendet werden (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden, entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleo-

sides"; Kap. 8 in: Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden aus Ribose-5-phosphat über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinsynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

D. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über eine α, α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A. und Lindquist, S. (1998) Trends Biotech. 16:460-467; Paiva, C.L.A. und Panek, A.D. (1996) Biotech Ann. Rev. 2:293-314; und Shiosaka, M. (1997) J. Japan 172:97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

II. Genetische Stabilität, Proteinsynthese und Proteinsekretion in *C. glutamicum*

Die Produktion einer gewünschten Verbindung von einer Zelle, wie *C. glutamicum*, ist die Kulmination einer großen Zahl an getrennten und trotzdem miteinander verknüpften Prozessen, von denen jeder für die Gesamtproduktion und die Freisetzung der Verbindung aus der Zelle entscheidend ist. Bei der Veränderung einer Zelle, so daß sie eine oder mehrere Chemikalien überproduziert, muß jeder dieser Prozesse berücksichtigt werden, um zu gewährleisten,

17

daß die biochemische Maschinerie der Zelle mit dieser genetischen Manipulation kompatibel ist. Besonders bedeutende zelluläre Mechanismen umfassen die Stabilität des/der veränderten Gen(s/e) beim Einbringen in die Zelle, die Fähigkeit der mutierten Gens, richtig transkribiert und translatiert zu werden (einschließlich der Codonverwendung) und die Fähigkeit des mutierten Proteinproduktes, richtig gefaltet und/oder sezerniert zu werden.

A. Bakterielle Reparatur- und Rekombinationssysteme

10

Zellen sind ständig nukleinsäureschädigenden Agenzien, wie UV-Strahlung, Sauerstoffradikale und Alkylierung, ausgesetzt. Ferner ist sogar die Wirkung von DNA-Polymerasen nicht fehlerfrei. Die Zellen müssen ein Gleichgewicht zwischen der genetischen Stabilität (die gewährleistet, daß Gene, die für zelluläre Funktionen notwendig sind, nicht während des normalen Wachstums und Stoffwechsels beschädigt werden) und der genetische Variabilität (die es den Zellen ermöglicht, sich an eine sich ändernde Umwelt anzupassen) aufrechterhalten. Daher gibt es in den meisten Zellen getrennte, aber miteinander zusammenhängende Wege für die DNA-Reparatur und DNA-Rekombination. Ersterer dient der strikten Korrektur von Fehlern in DNA-Molekülen durch entweder das direkte Rückgängigmachen der Schädigung oder durch Ausschneiden des geschädigten Bereichs und Ersetzen durch die korrekte Sequenz. Das letztere Rekombinationssystem repariert auch Nukleinsäuremoleküle, aber nur solche Schäden, die zu einer Schädigung in beiden DNA-Strängen führen, so daß kein Strang als Matrize zur Korrektur des anderen verwendet werden kann. Die Rekombinationsreparatur und die SOS-Reaktion können leicht zu Inversionen, Deletionen oder anderen genetischen Umlagerungen innerhalb des oder um den beschädigten Bereich führen, was wiederum einen bestimmten Grad an genomischer Instabilität fördert, der zur Fähigkeit der Zelle, sich an ändernde Umgebungen oder Streß anzupassen, beitragen kann.

35

High-fidelity-Reparaturmechanismen beinhalten das direkte Rückgängigmachen des DNA-Schadens und das Ausschneiden des Schadens und die Resynthese unter Verwendung der im Gegenstrang codierten Information. Das direkte Rückgängigmachen des Schadens erfordert ein Enzym mit einer Aktivität, die das Gegenteil desjenigen bewirkt, was ursprünglich die DNA beschädigt hat. Beispielsweise kann eine unrichtige Methylierung von DNA durch die Wirkung von DNA-Reparatur-Methyltransferasen korrigiert werden, und durch UV-Strahlung erzeugte Nukleotiddimere können durch die Aktivität der Desoxyribodipyrimidinphotolyase repariert werden, die in Gegenwart von Licht das Dimer wieder in die entsprechenden Nukleotide spaltet (s. Michal, G. (1999) Bio-

40

45

chemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley: New York, und die darin zitierten Literaturstellen).

- Die genaue Reparatur größerer Schäden erfordert spezialisierte
- 5 Reparaturmechanismen. Dazu gehören die Mismatch-Reparatur- und die Ausschneide-Reparatursysteme. Die Beschädigung einer einzelnen Base kann durch eine Reihe von Spaltungsreaktionen korrigiert werden, wobei zuerst die Zuckerbindung gespalten wird, gefolgt von Spaltung des DNA-Rückgrats an der beschädigten Stelle und
- 10 Entfernen der beschädigten Base selbst. Schließlich bewirken DNA-Polymerase und DNA-Ligase das Auffüllen und Versiegeln der Lücke unter Verwendung des zweiten DNA-Strangs als Matrize. Ein erheblicherer DNA-Schaden, der zu einer veränderten Konformation der Doppelhelix führt, wird durch das ABC-System korrigiert, bei dem
- 15 Helicase II, DNA-Polymerase I, die UvrA-, UvrB- und UvrC-Proteine zusammen die Doppelhelix an der beschädigten Stelle einzelsträngig spalten, den beschädigten Bereich auf ATP-abhängige Weise aufwinden, den beschädigten Bereich ausschneiden und den fehlenden Bereich mit dem anderen Strang als Matrize auffüllen.
- 20 Schließlich versiegelt die DNA-Ligase den Einzelstrangbruch. Spezifische Reparatursysteme gibt es auch für G-T-Mismatches (an denen das Vsr-Protein beteiligt ist) und für kleine Deletions-/Insertionsfehler aufgrund der falschen Reparatur der beiden Stränge (an denen der methylierungsgesteuerte Weg beteiligt ist).
- 25
- Es gibt auch Low-fidelity-Reparatursysteme, die gewöhnlich zur Korrektur sehr ausgedehnter DNA-Schäden bei Bakterien verwendet werden. Doppelstrangreparatur und Rekombination erfolgen bei Vorliegen einer Schädigung, die beide DNA-Stränge betrifft. In dieser Situation ist es unmöglich, den Schaden unter Verwendung des
- 30 anderen Strangs als Matrize zu reparieren. Somit beinhaltet das Reparatursystem ein Doppel-Crossover-Ereignis zwischen dem beschädigten Bereich und einer anderen Kopie des Bereichs auf einem homologen DNA-Molekül. Dies ist möglich, da sich Bakterien so
- 35 schnell teilen, daß eine zweite Kopie der genomischen DNA gewöhnlich verfügbar ist, bevor die Zellteilung tatsächlich stattfindet. Dieses Crossover-Ereignis kann leicht zu Inversionen, Duplikationen, Deletionen, Insertionen und anderen genetischen Umlagerungen führen und erhöht so insgesamt die genetische Instabilität des Organismus.
- 40

- Die SOS-Reaktion wird aktiviert, wenn eine ausreichende Schädigung in der DNA vorliegt, daß die DNA-Polymerase III anhält und nicht mit der Replikation fortfahren kann. Unter diesen Umständen
- 45 ist einzelsträngige DNA zugegen. Das RecA-Protein wird durch Bindung an einzelsträngige DNA aktiviert, und diese aktivierte Form führt zur Aktivierung des LexA-Repressors, wodurch der Transkrip-

19

tionsblock von mehr als 20 Genen aufgehoben wird, einschließlich UvrA, UvrB, UvrC, Helicase II, DNA pol III, UmuC und UmuD. Die kombinierten Aktivitäten dieser Enzyme bewirken ein ausreichendes Auffüllen des Lückenbereichs, daß DNA pol III die Replikation

- 5 wieder aufnehmen kann. Diese Lücken werden jedoch mit Basen aufgefüllt, die nicht vorliegen sollten; somit führt dieser Reparaturtyp zu einer fehleranfälligen Reparatur, was insgesamt zur genetischen Instabilität in der Zelle beiträgt.

10 B. Transposons

Die oben genannten Systeme mit High- oder Low-fidelity sollen DNA-Schäden reparieren. Unter bestimmten Umständen kann diese Reparatur zusätzliche Genumlagerungen umfassen. Viele Bakterienzellen haben außerdem Mechanismen, die spezifisch solche Genumlagerungen verursachen sollen. Besonders gut bekannte Beispiele für solche Mechanismen sind die Transposons.

- Transposons sind genetische Elemente, die von einer Stelle zu einer anderen entweder innerhalb eines Chromosoms oder zwischen einem Stück extrachromosomaler DNA (z.B. einem Plasmid) und einem Chromosom wandern können. Die Transposition auf auf mehrere Weisen erfolgen; beispielsweise kann das transponierbare Element aus der Donorstelle ausgeschnitten und in die Zielstelle integriert werden (nicht-replikative Transposition), oder das transponierbare Element kann alternativ von der Donorstelle zur Zielstelle dupliziert werden, was zwei Kopien des Elements ergibt (replikative Transposition). Gewöhnlich gibt es keine Sequenzverwandtschaft zwischen der Donor- und der Zielstelle.

- 30 Dieses Transpositionereignis hat eine Vielzahl möglicher Ergebnisse. Die Integration eines transposablen Elementes in ein Gen disruptiert das Gen, was dessen Funktion gewöhnlich völlig ausschaltet. Ein Integrationsereignis, das in der das Gen umgebenden DNA stattfindet, kann nicht die codierende Sequenz selbst stören, aber eine grundlegende Auswirkung auf die Regulation des Gens und somit auf seine Expression haben. Rekombinationsereignisse zwischen zwei Kopien eines transposablen Elementes, das sich in verschiedenen Abschnitten des Genoms befindet, können zu Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Transpositionen oder Amplifikationen von Segmenten des Genoms führen. Es ist auch möglich, daß verschiedene Replikons fusionieren.

- Die einfachsten transposonartigen genetischen Elemente werden als Insertions- (IS-) Elemente bezeichnet. IS-Elemente enthalten einen Nukleotidbereich variabler Länge (aber gewöhnlich weniger als 1500 Basen), der keine codierenden Bereiche enthält und an jedem

20

ende von Inverted Repeats umgeben ist. Da das IS-Element keine Proteine codiert, deren Aktivität nachgewiesen werden kann, wird das Vorliegen eines IS-Elementes gewöhnlich nur aufgrund eines Funktionsverlustes von einem oder mehreren Genen, in die das IS-Element inseriert ist, beobachtet.

Transposons sind mobile genetische Elemente, die im Gegensatz zu IS-Elementen von Repeats begrenzte Nukleinsäuresequenzen enthalten, die ein oder mehrere Proteine codieren können. Es ist nicht ungewöhnlich, daß diese Repeatbereiche aus IS-Elementen bestehen. Die vom Transposon codierten Proteine sind gewöhnlich Transposasen (Proteine, die die Wanderung des Transposons von einer Stelle zur anderen katalysieren) und Antibiotika-Resistenzgene. Die Mechanismen und die Regulation der transposablen Elemente sind im Fachgebiet bekannt und wurden zumindest bspw. beschrieben in: Lengeler et al. (1999) *Biology of Prokaryotes*, Thieme Verlag: Stuttgart, S. 375-361; Neidhardt et al. (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*, ASM Press: Washington, D.C.; Sonenshein, Al.L., et al., Hrsg. (1993) *Bacillus subtilis*, ASM Press, Washington, D.C.; Voet, D., und Voet, J.G. (1992) *Biochemie*, VCH: Weinheim, S. 985-990; Brock, T.D., und Madigan, M.T. (1991) *Biology of Microorganisms*, 6. Aufl. Prentice Hall: New York, S. 267-269; und Kleckner, N. (1990) "Regulation of transposition in bacteria", *Annu. Rev. Biochem.* 61:297-327.

25

C. Transkription

Die Genexpression in Bakterien wird hauptsächlich auf der Ebene der Transkription reguliert. Der Transkriptionsapparat besteht aus einer Reihe von Proteinen, die man in zwei Gruppen einteilen kann: RNA-Polymerase (das operierende DNA-transkribierende Enzym) und Sigma-Faktoren (die die Gentranskription regulieren, indem sie die RNA-Polymerase zu spezifischer Promotor-DNA-Sequenzen lenken, die diese Faktoren erkennen). Die Kombination von RNA-Polymerase und Sigma-Faktoren erzeugt das RNA-Polymerase-Holoenzym, einen aktivierten Komplex. Gram-positive Bakterien, wie Corynebakterien, enthalten nur einen Typ der RNA-Polymerase, aber eine Anzahl verschiedener Sigma-Faktoren, die für verschiedene Promotoren, Wachstumsphasen, Umweltbedingungen, Substrate, Sauerstoffspiegel, Transportprozesse und dgl. Spezifisch sind, wodurch sich der Organismus an verschiedene Umwelt- und Stoffwechselbedingungen anpassen kann.

Promotoren sind spezifische DNA-Sequenzen, die als Andockstellen für das RNA-Polymerase-Holoenzym dienen. Viele Promotorelemente besitzen konservierte Sequenzelemente, die durch Homologiesuchen erkannt werden können; alternativ können Promotorbereiche für ein

21

bestimmtes Gen unter Verwendung von Standard-Techniken, wie Primerextension, identifiziert werden. Viele Promotorbereiche von gram-positiven Bakterien sind bekannt (s. z.B. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., und Losick, R., Hrsg. (1993) *Bacillus subtilis*, ASM Press: Washington, D.C.).

Die Promotor-Transkriptionskontrolle wird durch mehrere Repressions- oder Aktivierungsmechanismen beeinflusst. Spezifische regulatorische Proteine, die an Promotoren binden, haben die Fähigkeit, die Bindung des RNA-Holoenzym zu blockieren (Repressoren) oder diese zu unterstützen (Aktivatoren) und so die Transkription zu regulieren. Die Bindung dieser Repressor- und Aktivatormoleküle wird wiederum durch ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen, wie Proteinen oder anderen Stoffwechselverbindungen, reguliert. Die Transkription kann alternativ durch Faktoren reguliert werden, die Prozesse, wie die Elongation oder Termination beeinflussen (s. z.B. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., und Losick, R., Hrsg. (1993) *Bacillus subtilis*, ASM Press: Washington, D.C.). Durch die Fähigkeit, die Transkription von Genen als Reaktion auf eine Vielzahl von Umwelt- oder Stoffwechselzeichen zu regulieren, können die Zellen genau steuern, wann ein Gen exprimiert werden kann und wieviel eines Genproduktes in der Zelle zu einem Zeitpunkt vorliegen kann. Dies verhindert wiederum die unnötige Verschwendung von Energie oder die unnötige Verwendung möglicherweise rarer Zwischenverbindungen oder Cofaktoren.

D. Translation und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Die Translation ist der Prozeß, durch den ein Polypeptid aus Aminosäuren gemäß der in einem RNA-Molekül enthaltenen Information synthetisiert wird. Die Hauptkomponenten dieses Prozesses sind Ribosomen und spezifische Initiations- oder Elongationsfaktoren, wie IF1-3, ERFINDUNGSGEMÄSS-G und EFTu (s. z.B. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., und Losick, R., Hrsg. (1993) *Bacillus subtilis*, ASM Press: Washington, D.C.).

Jedes Codon des mRNA-Moleküls codiert eine bestimmte Aminosäure. Die Umwandlung von mRNA in Aminosäure wird durch Transfer-RNA- (tRNA-) Moleküle durchgeführt. Diese Moleküle bestehen aus einem RNA-Einzelstrang (zwischen 60 und 100 Basen), der in einer L-förmigen dreidimensionalen Struktur mit hinausragenden Bereichen oder "Armen" vorliegt. Einer dieser Arme bildet Basenpaare mit einer bestimmten Codonsequenz auf dem mRNA-Molekül. Ein zweiter Arm interagiert spezifisch mit einer bestimmten Aminosäure (die vom Codon codiert wird). Andere tRNA-Arme umfassen den variablen Arm, den T^ΨC-Arm (der Thymidylat- und Pseudouridylatmodifikationen trägt) und den D-Arm (der eine Dihydrouridinmodifikation

22

trägt). Die Funktion dieser letzteren Strukturen ist immer noch unbekannt, aber ihre Konservierung zwischen den tRNA-Molekülen legt eine Rolle bei der Proteinsynthese nahe.

- 5 Damit das auf Nukleinsäure basierende tRNA-Molekül sich mit der korrekten Aminosäure paart, muß eine Familie von Enzymen, die als Aminoacyl-tRNA-Synthetasen bezeichnet werden, wirken. Es gibt viele verschiedene dieser Enzyme, und jedes ist spezifisch für eine bestimmte tRNA und eine bestimmte Aminosäure. Diese Enzyme
- 10 binden das 3'-Hydroxyl der endständigen tRNA-Adenosin-Ribose-Einheit in einer Zwei-Schritt-Reaktion an die Aminosäure. Zuerst wird das Enzym durch Reaktion mit ATP und der Aminosäure aktiviert, woraus ein Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Aminoacyl-Adenylat-Komplex resultiert. Zweitens wird die Aminoacylgruppe vom Enzym
- 15 auf die Ziel-tRNA übertragen, an der sie in einem energiereichen Zustand bleibt. Die Bindung des tRNA-Moleküls an sein Erkennungscodon auf dem mRNA-Molekül bringt dann die an die tRNA gebundene energiereiche Aminosäure in Kontakt mit dem Ribosom. Innerhalb des Ribosoms besetzt die Aminosäure-beladene tRNA (Aminoacyl-
- 20 tRNA) eine Bindungsstelle (die A-Stelle) neben einer zweiten Stelle (der P-Stelle), die ein tRNA-Molekül trägt, dessen Aminosäure an die naszierende Polypeptidkette gebunden ist (Peptidyl-tRNA). Die aktivierte Aminosäure an der Aminoacyl-tRNA ist ausreichend reaktiv, daß sich spontan eine Peptidbindung zwischen
- 25 dieser Aminosäure und der nächsten Aminosäure an der naszierenden Polypeptidkette bildet. Die GTP-Hydrolyse liefert die Energie zum Transfer der jetzt mit der Polypeptidkette beladenen tRNA von der A-Stelle zur P-Stelle des Ribosoms, und der Prozeß wiederholt sich, bis ein Stopcodon erreicht wird.
- 30
- Es gibt eine Reihe verschiedener Schritte, an denen die Translation reguliert werden kann. Dazu gehören die Bindung des Ribosoms an mRNA, das Vorliegen von mRNA-Sekundärstruktur, die Codonverwendung oder die Häufigkeit bestimmter tRNAs. Auch spezielle Re-
- 35 gulationsmechanismen, wie Attenuation, können auf der Translationsebene wirken. Eine tiefgreifende Übersicht über viele dieser Mechanismen s. z.B. in Vellanoweth, R.L. (1993) "Translation and its Regulation", in: *Bacillus subtilis* and other Gram Positive Bacteria, Sonenshein, A.L., et al., Hrsg., ASM Press: Washington,
- 40 D.C., S. 699-711 und die darin zitierten Literaturstellen.

E. Proteinfaltung und -Sekretion

- Die Synthese von Proteinen durch das Ribosom führt zu Polypeptid-
- 45 ketten, die eine dreidimensionale Form annehmen müssen, bevor das Protein normal funktionieren kann. Die dreidimensionale Struktur wird durch einen Faltungsprozeß erzielt. Polypeptidketten sind

23

flexibel und bewegen sich (im Prinzip) leicht und frei in Lösung, bis sie eine Konformation annehmen, die zu einer stabilen dreidimensionalen Struktur führt. Manchmal ist es jedoch für Proteine schwierig, sich richtig zu falten, entweder aufgrund der Umweltbedingungen (z.B. hohe Temperatur, bei der die im System vorhandene kinetische Energie es dem Protein schwieriger macht, in das Energieloch einer stabilen Struktur zu fallen) oder aufgrund der Art des Proteins selbst (z.B. neigen hydrophobe Bereiche in nahe beieinander befindlichen Proteinen zur Aggregation, wodurch sie sich selbst aus wässrigen Lösungen ausfällen).

Proteinartige Faktoren sind identifiziert worden, die die Faltung von Proteinen katalysieren, begleiten oder anderweitig unterstützen können und co- oder posttranslational synthetisiert werden.

15 Zu diesen Proteinfaltungsmolekülen gehören die Prolyl-Peptidyl-Isomerasen (z.B. Trigger-Faktor, Cyclophilin und FKBP-Homologa) sowie Proteine der Hitzeschockprotein-Gruppe (z.B. DnaK, DnaJ, GroEL, kleine Hitzeschockproteine, HtpG und Mitglieder der Clp-Familie (z.B. ClpA, ClpB, ClpW, ClpP und ClpX). Viele dieser Proteine sind für die Lebensfähigkeit von Zellen wichtig: zusätzlich zu ihrer Funktion bei der Proteinfaltung, -translokation und -prozessierung dienen sie häufig als Ziele für die Gesamtregulation der Proteinsynthese (s. z.B. Bukau, B. (1993) *Molecular Microbiology* 9(4):671-680; Bukau, B., und Horwich, A.L. (1998) *Cell* 92(3):351-366; Hesterkamp, T., Bukau, C. (1996) *FEBS Lett.* 389(1):32-34; Yaron, A., Naider, F. (1993) *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28(1):31-81; Scheibel, R., Buchner, J. (1998) *Biochemical Pharmacology* 56(6):675-682; Ellis, R.J., Hartl, F.U. (1996) *FASEB Journal* 10(1):20-26; Wawrzynow, A., et al. (1996) *Molecular Microbiology* 21(5):895-899; Ewalt, K.L., et al. (1997) *Cell* 90(3):491-500).

Die bisher identifizierten Chaperone wirken auf zwei Weisen: sie binden entweder an Polypeptide und stabilisieren diese oder sie stellen eine Umgebung bereit, in der die Faltung ohne Störung stattfinden kann. Die erstere Gruppe, einschließlich z.B. DnaK, DnaJ und der Hitzeschockproteine, bindet direkt an das naszierende oder falsch gefaltete Polypeptid, häufig begleitet von ATP-Hydrolyse. Die Bindung des Chaperons verhindert, daß das Polypeptid mit anderen Polypeptiden aggregiert, und kann die Auflösung dieser Aggregate, wenn sie sich bereits gebildet haben, erzwingen. Nach der Wechselwirkung mit einem zweiten Chaperon GrpE (das das Auftreten eines ADP-ATP-Austauschs ermöglicht) wird das Polypeptid im Molten-globule-Zustand freigesetzt und kann sich falten. Wenn eine falsche Faltung auftritt, binden die Chaperone wieder an das falsch gefaltete Protein und erzwingen seine Rückkehr in einen ungefalteten Zustand. Dieser Zyklus kann wiederholt

24

werden, bis das Protein korrekt gefaltet ist. Im Gegensatz zur ersten Chaperongruppe, die einfach an das Polypeptid bindet, bindet die zweite Gruppe (z.B. GroEL/ES) nicht nur an das Polypeptid, sondern umgibt es vollständig, so daß es vor der Umgebung geschützt ist. Der GroEL/ES-Komplex besteht aus zwei aufeinander-gestapelten 14-gliedrigen Ringen mit einer hydrophoben inneren Oberfläche und einem "Deckel" aus einem 7-gliedrigen Ring. Das Polypeptid wird in einer ATP-abhängigen Reaktion in den Kanal im Zentrum dieses Komplexes gezogen, wo es sich ohne Störung durch andere Polypeptide falten kann. Falsch gefaltete Proteine werden nicht aus dem Komplex freigesetzt.

Ein wichtiger Schritt bei der Proteinfaltung ist die Bildung von Disulfidbindungen. Diese Bindungen, entweder innerhalb einer Untereinheit oder zwischen Untereinheiten von Proteinen, sind für die Proteinstabilität wichtig. Disulfidbindungen bilden sich leicht in wäßriger Lösung, und es ist schwierig, eine falsche Disulfidbrückenbildung ohne Hilfe einer reduzierenden Umgebung rückgängig zu machen. Zur Unterstützung dieses Prozesses der korrekten Disulfidbrückenbildung findet man im Cytosol der meisten Zellen thiolhaltige Moleküle, wie Glutathion oder Thioredoxin und ihre entsprechenden Oxidations-/Reduktionssysteme (Loferer, H., Hennecke, H. (1994) Trends in Biochemical Sciences 19(4):169-171).

Zu bestimmten Zeiten ist jedoch die Faltung naszierender Polypeptidkette nicht wünschenswert, bspw. wenn diese Proteine sezerniert werden sollen. Der Faltungsprozeß führt gewöhnlich dazu, daß die hydrophoben Bereiche des Proteins sich im Zentrum des Proteins, entfernt von der wäßrigen Lösung, befinden und die hydrophilen Bereiche an den äußeren Oberflächen des Proteins präsentiert werden. Diese Konformationsanordnung erzeugt zwar eine höherer Stabilität für das Protein, erschwert aber die Translokation des Proteins über Membranen, da der hydrophobe Kern der Membran an sich inkompatibel mit dem hydrophilen Äußeren des Proteins ist. So werden die von der Zelle synthetisierten Proteine, die zum Äußeren der Zelle sezerniert werden müssen (z.B. Zelloberflächenenzyme und Membranrezeptoren) oder die in die Membran selbst inseriert werden müssen (z.B. Transporterproteine und Kanalproteine), gewöhnlich vor der Faltung sezerniert oder inseriert. Die gleichen Chaperone, die die Aggregation naszierender Polypeptidketten verhindern, verhindern auch die Faltung von Polypeptiden, bis sie nicht mehr gebraucht werden. Somit können diese Proteine naszierende Polypeptidketten zu einem geeigneten Ort in der Zelle "eskortieren", wo sie entweder entfernt werden, so daß die Faltung möglich wird, oder das Protein auf ein Trans-

portssystem übertragen, das entweder das Polypeptid sezerniert oder seine Insertion in eine Membran unterstützt.

- Im Verlauf der Evolution hat sich eine spezialisierte Proteinma-
- 5 schinerie gebildet, die Proteine mit spezifischen Prosequenzen (die später durch Spaltung aus dem Protein entfernt werden) erkennt, bindet, transportiert und prozessiert. Die Maschinerie besteht aus einer Reihe von Proteinen, die man gemeinsam als sec (Typ-II-Sekretions-) System bezeichnet (eine Übersicht s. in Gil-
- 10 bert, M., et al. (1995) Critical Reviews in Biotechnology 15(1):13-39 und den Literaturstellen darin; Freudl, R. (1992) Journal of Biotechnology 23(3):231-240 und Literaturstellen darin; Neidhardt, F.C., et al. (1996) *E. coli* and *Salmonella*, ASM Press: Washington, D.C., S. 967-978; Binet, R., et al. (1997)
- 15 Gene 192(1):7-11 und Rapoport, T.A. (1986) Critical Reviews in Biochemistry 20(1):73-137 und Literaturstellen darin). Das sec-System besteht aus Chaperonen (z.B. SecA und SecB), integralen Membranproteinen, die auch als Translokasen bezeichnet werden (z.B. SecY, SecE und SecG) und Signalpeptidasen (z.B. LepB). Das
- 20 naszierende Polypeptid mit einer prosequenz, die zur Sekretion führt, wird von SecB gebunden, das es an SecA an der inneren Oberfläche der Zellmembran übergibt. SecA bindet an die Prosequenz und inseriert nach ATP-Hydrolyse in die Membran und zwingt auch einen Teil des Polypeptids durch die Membran. Der Rest des
- 25 Polypeptids wird durch einen Komplex aus Translokasen, wie SecY, SecE und SecG, durch die Membran geleitet. Schließlich spaltet die Signalpeptidase die Prosequenz ab, und das Polypeptid befindet sich frei auf der extrazellulären Seite der Membran, wo es sich spontan faltet.
- 30
- Auch Sec-unabhängige Sekretionsmechanismen sind bekannt. Beispielsweise umfaßt der Signalerkennungspartikel-abhängige Weg die Bindung eines Signalerkennungspartikel- (SRP-) Proteins an das
- naszierende Polypeptid während seiner Synthese, wodurch das Ribosom anhält. Ein Rezeptor für SRP an der inneren Oberfläche der
- 35 Membran bindet dann den Ribosom-Polypeptid-SRP-Komplex. GTP-Hydrolyse liefert die Energie, die zur Übertragung des Komplexes auf den sec-Translokase-Komplex nötig ist, an dem das Polypeptid während seiner Synthese durch das Ribosom über die Membran geleitet wird. Bekanntlich existieren andere, für nur wenige Proteine spezifische Sekretionsmechanismen.
- 40

III. Elemente und Verfahren der Erfindung

- 45 Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung von neuen Molekülen, die hier als SES-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle bezeichnet werden und an der Reparatur oder Re-

26

kombination von DNA in *C. glutamicum*, Transposition oder anderen Umlagerung von *C. glutamicum*-DNA, Genexpression in *C. glutamicum* (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion diese Mikroorganismus teilnehmen. In einer Ausführungsform nehmen die SES-Moleküle an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teil. In einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der erfindungsgemäßen SES-Moleküle bezüglich der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von DNA, Genexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion eine Auswirkung auf die Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der erfindungsgemäßen SES-Moleküle moduliert, so daß auch die Aktivität der *C. glutamicum*-Zellprozesse, an denen die erfindungsgemäßen SES-Proteine beteiligt sind, (z.B. Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von DNA, Genexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion) verändert ist, was direkt oder indirekt zu einer Modulation der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch *C. glutamicum* führt.

Der Begriff "SES-Protein" oder "SES-Polypeptid" umfaßt Proteine, die an einer Reihe von Zellprozessen beteiligt sind, die zur genetischen Stabilität, Genexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion von *C. glutamicum* in Beziehung stehen. Beispielsweise kann ein SES-Protein an der DNA-Reparatur oder an Rekombinationsmechanismen bei *C. glutamicum*, Umlagerungen des genetischen Materials von *C. glutamicum* (wie den von Transposons vermittelten), der Transkription oder Translation von Genes in diesem Mikroorganismus, bei der Vermittlung der Proteinfaltung in *C. glutamicum* (wie der Aktivität von Chaperonen) oder der Sekretion von Proteinen aus *C. glutamicum*-Zellen (z.B. am sec-System) beteiligt sein. Beispiele für SES-Proteine umfassen solche, die von den in Tabelle 1 und Anhang A aufgeführten SES-Genen codiert werden. Die Ausdrücke "SES-Gen" oder "SES-Nukleinsäuresequenz" umfassen Nukleinsäuresequenzen, die ein SES-Protein codieren, das aus einem codierenden Bereich und entsprechenden untranslatierten 5'- und 3'-Sequenzbereichen besteht. Beispiele für SES-Gene sind die in Tabelle 1 aufgelisteten. Die Begriffe "Produktion" oder "Produktivität" sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (bspw. der gewünschten Feinchemikalie), das innerhalb einer festgelegten Zeitspanne und eines festgelegten Fermentationsvolumens gebildet wird (bspw. kg Produkt pro Std. pro l). Der Begriff "Effizienz der Produktion" umfaßt die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktions-

27

- menge nötig ist (bspw. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Ausstoßrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff "Ausbeute" oder "Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird bspw. gewöhnlich ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Vergrößern der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe "Biosynthese" oder "Biosyntheseweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß.
- 15 Die Begriffe "Abbau" oder "Abbauweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle), bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß. Der Begriff
- 20 "Metabolismus" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Metabolismus einer bestimmten Verbindung (z.B. der Metabolismus einer Aminosäure, wie Glycin) umfaßt dann sämtliche Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege in der Zelle, die
- 25 diese Verbindung betreffen. Der Begriff "DNA-Reparatur" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet zelluläre Mechanismen, durch die Fehler in der DNA (entweder aufgrund von Schäden, wie, aber nicht beschränkt auf Ultraviolettbestrahlung, Methyhasen, Low-fidelity-Replikation oder Mutagene) ausgeschnitten und korrigiert
- 30 werden. Der Ausdruck "Rekombination" oder "DNA-Rekombination" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt zelluläre Mechanismen, durch die ausgedehnte DNA-Schäden, die beide Stränge eines DNA-Moleküls betreffen, durch homologe Rekombination mit einer anderen unbeschädigten Kopie des DNA-Moleküls innerhalb der gleichen Zelle korrigiert werden. Diese Reparaturen sind gewöhnlich low-fidelity und können zu Genumlagerungen führen. Der Begriff "Transposon" ist im
- 35 Fachgebiet bekannt und umfaßt ein DNA-Element, das zufallsgemäß in das Genom eines Organismus inserieren kann und zur Disruption von Genen oder ihrer regulatorischen Bereiche oder zu Duplikationen, Inversionen, Deletionen und anderen Genumlagerungen führen kann. Der Begriff "Proteinfaltung" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Wanderung einer Polypeptidkette durch mehrere dreidimensionale Konfigurationen, bis die stabile, aktive, dreidimensionale Konfiguration erzielt wird. Die Bildung von Disulfidbindungen und die Sequestrierung hydrophober Bereiche aus der umgebenden wäßrigen Lösung liefern einige der Antriebskräfte für diesen Proteinfaltungsprozeß, und die korrekte Faltung kann durch
- 45

die Aktivität von Chaperonen verstärkt werden. Die Begriffe "Sekretion" oder "Proteinsekretion" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Bewegung von Proteinen vom Inneren der Zelle zum Äußeren der Zelle in einem Mechanismus, bei dem ein System von

5 Sekretionsproteinen ihren Durchtritt über die Zellmembran zum Äußeren der Zelle ermöglicht.

Die erfindungsgemäßen SES-Moleküle sind in einer anderen Ausführungsform befähigt, die Produktion eines gewünschten Moleküls,

10 wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*, zu modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen SES-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C. glutamicum*-Stamm, der dieses veränderte

15 Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Zum Beispiel sollte die Modulation von Proteinen, die direkt an der Transkription oder Translation beteiligt sind (z.B. Polymerasen oder Ribosomen), so daß ihre Anzahl oder Aktivität gesteigert wird, die zelluläre Transkription oder Translation (oder die Geschwindigkeiten

20 dieser Prozesse) insgesamt steigern. Diese erhöhte zelluläre Genexpression sollte solche Proteine umfassen, die an der Feinchemikalienbiosynthese beteiligt sind, so daß eine Steigerung der Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer gewünschten Verbindungen erfolgen kann. Modifikationen

25 der Transkriptions-/Translations-Proteinmaschinerie von *C. glutamicum*, so daß die Regulation dieser Proteine verändert wird, kann auch die erhöhte Expression von Genen, die an der Produktion von Feinchemikalien beteiligt sind, ermöglichen. Die Modulation der Aktivität einer Reihe von Proteinen, die an der Peptidfaltung be-

30 teilt sind, kann eine Erhöhung der Gesamtproduktion korrekt gefalteter Moleküle in der Zelle ermöglichen, wodurch die Möglichkeit erhöht wird, daß gewünschte Proteine (z.B. Feinchemikalienbiosynthese-Proteine) richtig funktionieren können. Ferner kann es durch Mutation von an der Sekretion aus *C. glutamicum* betei-

35 ligten Proteinen, so daß ihre Anzahl oder Aktivität erhöht ist, möglich sein, die Sekretion einer Feinchemikalie (z.B. eines Enzyms) aus Zellen in der Fermentationskultur zu erhöhen, aus der sie leicht gewonnen werden kann.

40 Die genetische Modifikation der erfindungsgemäßen SES-Moleküle kann auch zu einer indirekten Modulation der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien führen. Beispielsweise kann man durch Erhöhen der Anzahl oder Aktivität eines erfindungsgemäßen DNA-Reparatur- oder -Rekombinationsproteins die Fähigkeit der

45 Zelle, eine DNA-Schädigung zu entdecken und zu reparieren, erhöhen. Dies sollte die Fähigkeit der Zelle, ein mutiertes Gen in ihrem Genom zu halten, wirksam erhöhen und dadurch die Wahr-

29

- scheinlichkeit erhöhen, daß ein gentechnologisch in *C. glutamicum* eingebrachtes Transgen (das z.B. ein Protein codiert, das die Biosynthese einer Feinchemikalie steigert) nicht während der Züchtung des Mikroorganismus verloren geht. Dagegen kann es durch
- 5 Verringern der Anzahl oder Aktivität eines oder mehrerer DNA-Reparatur- oder -Rekombinationsproteine möglich sein, die genetische Instabilität des Organismus zu steigern. Diese Manipulationen sollten die Fähigkeit des Organismus, durch Mutagenese modifiziert zu werden, verbessern, ohne daß die eingebrachte Mutation
- 10 berichtet wird. Das gleiche gilt für Proteine, die an der Transposition oder Umlagerung genetischer Elemente in *C. glutamicum* beteiligt sind (z.B. Transposons). Durch Mutagenese dieser Proteine, so daß ihre Anzahl oder Aktivität entweder gesteigert oder verringert wird, ist es möglich, gleichzeitig die genetische Sta-
- 15 bilität des Mikroorganismus zu steigern oder zu verringern. Dies hat eine bedeutende Auswirkung darauf, daß eine andere Mutation in *C. glutamicum* eingebracht und die eingebrachte Mutation beibehalten werden kann. Transposons bieten ebenfalls einen geeigneten Mechanismus, durch den die Mutagenese von *C. glutamicum* durchge-
- 20 führt werden kann; die Duplikation gewünschter Gene (z.B. von Feinchemikalienbiosynthese-Genen) läßt sich leicht mittels Transposonmutagenese durchführen, wie auch die Disruption ungewünschter Gene (z.B. Gene, die am Abbau gewünschter Feinchemikalien beteiligt sind).
- 25
- Durch die Modulation eines oder mehrerer Proteine (z.B. Sigma-Faktoren), die an der Regulation der Transkription oder Translation in Reaktion auf besondere Umweltbedingungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Zelle daran zu hindern, daß sie die
- 30 Proteinsynthese unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie man sie in einer Fermenterkultur im Großmaßstab antrifft, verlangsamt oder beendet. Dies sollte zu erhöhter Genexpression führen, was wiederum die gesteigerte Biosynthese gewünschter Feinchemikalien unter diesen Bedingungen ermöglichen kann. Viele dieser sezer-
- 35 nierten Proteine haben Funktionen, die für die Zellebensfähigkeit wichtig sind (z.B. Zelloberflächenproteasen oder -Rezeptoren). Eine Änderung des Sekretionswegs, so daß diese Proteine leichter an ihren extrazellulären Ort transportiert werden, kann die Gesamtlebensfähigkeit der Zelle erhöhen und somit zu höheren Zahlen
- 40 an *C. glutamicum*-Zellen führen, die Feinchemikalien während eine Züchtung im Großmaßstab produzieren können. Da ferner bestimmte bakterielle Proteinsekretionswege (z.B. das sec-System) bekanntlich auch an der Insertion von integralen Membranproteinen (z.B. Rezeptoren, Kanälen, Poren oder Transportern) in die Membran be-
- 45 teilt sind, kann die Modulation der Aktivität von Proteinen, die an der Proteinsekretion aus *C. glutamicum* beteiligt sind, die Fähigkeit der Zelle zur Ausscheidung von Abfallprodukten oder zum

30

Import notwendiger Metabolite beeinflussen. Ist die Aktivität dieser sekretorischen Proteine erhöht, kann ebenfalls die Fähigkeit der Zelle zur Produktion von Feinchemikalien (durch ein gesteigertes Vorliegen von Transportern/Kanälen in der Membran, die Nährstoffe importieren oder Abfallprodukte ausscheiden können) erhöht sein. Ist die Aktivität dieser sekretorischen Proteine verringert, können nicht genügend Nährstoffe zur Unterstützung der Überproduktion gewünschter Verbindungen vorhanden sein, oder Abfallprodukte können diese Biosynthese stören.

10

Die isolierten erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen befinden sich im Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist. Die Nukleotidsequenz der isolierten *C. glutamicum*-SES-cDNAs und die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der *C. glutamicum*-SES-Proteine sind im Anhang A bzw. B gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die viele dieser Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizierten und/oder identifizierten, die an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* beteiligt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine, deren Aminosäuresequenz zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B im wesentlichen homolog ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein, dessen Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz ist, zumindest zu etwa 50% homolog zu der ausgewählten Aminosäuresequenz, bspw. zur gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist, kann auch mindestens zu etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens zu etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens zu etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zur ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

Das erfindungsgemäße SES-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt oder Fragment davon kann an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 beschriebenen Aktivitäten haben.

45

31

In den nachstehenden Unterabschnitten sind verschiedene Aspekte der Erfindung ausführlicher beschrieben:

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

5

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die SES-Polypeptide oder biologisch aktive Abschnitte davon codieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von SES-codierenden Nukleinsäuren (z.B. SES-DNA) hinreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül", wie hier verwendet, soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfaßt zudem die am 3'- und am 5'-Ende des codierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des codierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des codierenden Bereichs des Gens. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, die die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (bspw. Sequenzen, die sich am 5'- bzw. 3'-Ende der Nukleinsäure befinden). In verschiedenen Ausführungsformen kann bspw. das isolierte SES-Nukleinsäuremolekül weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb der Nukleotidsequenzen, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (bspw. eine *C. glutamicum*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, bspw. eine Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Bspw. kann eine *C. glutamicum*-SES-cDNA aus einer *C. glutamicum*-Bank isoliert werden, indem eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie bspw. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A

32

- Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder einen Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei
- 5 Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder einen Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isoliert werden, indem Oligonukleotidprimer verwendet werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz aus Anhang A erstellt worden sind). Bspw. läßt sich mRNA aus normalen Endothelzellen isolieren (bspw. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299), und die cDNA kann mittels
- 10 reverser Transkriptase (bspw. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich bei Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) hergestellt werden. Synthetische Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung via Polymerasekettenreaktion lassen sich auf der
- 20 Basis einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann mittels cDNA oder alternativ genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß PCR-Standard-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen
- 25 geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer SES-Nukleotidsequenz entsprechen, können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, bspw. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
- 30
- Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen. Die Sequenzen von Anhang A entsprechen den erfindungsgemäßen SES-cDNAs aus *Corynebacterium glutamicum*. Diese cDNAs umfassen Sequenzen, die SES-Proteine (d.h. den
- 35 "codierenden Bereich", der in jeder Sequenz in Anhang A angegeben ist), sowie die 5'- und 3'-untranslatierten Sequenzen, die ebenfalls in Anhang A angegeben sind. Das Nukleinsäuremolekül kann alternativ nur den codierenden Bereich einer der Sequenzen in An-
- 40 hang A umfassen.

- Für die Zwecke dieser Anmeldung hat selbstverständlich jede der in Anhang A angegebenen Sequenzen eine RXA- oder RXN-Identifizierungsnummer, wobei hinter der Bezeichnung "RXA" oder "RXN" 5 Ziffern aufgeführt sind (bspw. RXA00005). Jede dieser Sequenzen umfaßt bis zu drei Abschnitte: einen stromaufwärts gelegenen 5'-Bereich, einen codierenden Bereich, und einen stromabwärts geleg-
- 45

33

nen Bereich. Jeder dieser drei Bereiche ist durch die gleiche RXA- oder RXN-Bezeichnung gekennzeichnet, um Verwirrung zu vermeiden. Die Bezeichnung "eine der Sequenzen in Anhang A" steht dann für eine der Sequenzen in Anhang A, die sich durch ihre unterschiedlichen RXA- oder RXN-Nummern unterscheiden lassen. Der codierende Bereich jeder Sequenz wird in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert, die in Anhang B angegeben ist. Die Sequenzen in Anhang B werden durch die gleichen RXA- oder RXN-Nummern wie in Anhang A identifiziert, so daß sie sich leicht zuordnen lassen. Bspw. ist die mit RXA00005 bezeichnete Aminosäuresequenz in Anhang B eine Translation des codierenden Bereichs der Nukleotidsequenz des Nukleinsäuremoleküls RXA00005 in Anhang A.

Bei einer Ausführungsform sollen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle nicht die in Tabelle 2 zusammengestellten umfassen. Eine Sequenz für das *dapD*-Gen wurde in Wehrmann, A. et al. (1998) J. Bacteriol. 180(12): 3159-3165 veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Patentanmeldung gewonnene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht und somit nur ein Fragment des eigentlichen codierenden Bereichs ausmacht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen komplementäres Nukleinsäuremolekül oder einen Abschnitt davon, wobei es sich um ein Nukleinsäuremolekül handelt, das zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen hinreichend komplementär ist, daß es mit einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer in Anhang A angegebenen Nukleotidsequenz oder einem Abschnitt davon ist. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, mit einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen oder einem Abschnitt davon hybridisiert.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kann überdies nur einen Abschnitt des codierenden Bereichs von einer der Sequenzen in Anhang A umfassen, bspw. ein Fragment, das als Sonde oder Primer

34

- oder Fragment verwendet werden kann, welches einen biologisch aktiven Abschnitt eines SES-Proteins codiert. Die aus der Klonierung der SES-Gene aus *C. glutamicum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur
- 5 Identifizierung und/oder Klonierung von SES-Homologa in anderen Zelltypen und Organismen und SES-Homologa von anderen *Corynebakterien* oder verwandten Arten ausgelegt sind. Die Sonde bzw. der Primer umfaßt gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfaßt gewöhnlich einen Nukleotidsequenz-
- 10 bereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 25, stärker bevorzugt etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen oder natürlich vorkom-
- 15 menden Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz aus Anhang A können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von SES-Homologa verwendet werden. Sonden auf der Basis der SES-Nukleotidsequenzen können zum Nachweisen von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe Pro-
- 20 teine codieren, verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, bspw. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines diagnostischen Test-Kits zur Identifizierung von Zellen
- 25 verwendet werden, die ein SES-Protein mißexpressieren, bspw. durch Messen einer Menge einer SES-codierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, bspw. durch Nachweisen der SES-mRNA-Spiegel oder durch Bestimmen, ob ein genomisches SES-Gen mutiert oder deletiert ist.
- 30
- Bei einer Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Abschnitt davon, der eine Aminosäuresequenz umfaßt, die hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B ist, daß das Protein oder ein Abschnitt
- 35 davon die Fähigkeit behält, an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilzunehmen. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "hinreichend ho-
- 40 molog" Proteine oder Abschnitte davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter (bspw. einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen von Anhang B) Aminosäurereste zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweisen, so daß das Pro-
- 45 tein oder ein Abschnitt davon an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfal-

35

tung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann. An der genetischen Stabilität, Genexpression, Proteinfaltung oder Proteinsekretion von *C. glutamicum* beteiligte Proteine, wie hier beschrieben, können eine Rolle bei der Produktion und Sekretion einer oder mehrerer Feinchemikalien spielen. Beispiele dieser Aktivitäten sind ebenfalls hier beschrieben. Somit trägt die "Funktion eines SES-Proteins" direkt oder indirekt zur Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien bei. Beispiele für SES-Proteine sind in Tabelle 1 gezeigt.

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B.

Abschnitte von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen SES-Nukleinsäuremolekülen codiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Abschnitte von einem der SES-Proteine. Der Begriff "biologisch aktiver Abschnitt eines SES-Proteins", wie er hier verwendet wird, soll einen Abschnitt, bspw. eine Domäne/ein Motiv eines SES-Proteins, umfassen, die/das an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnimmt oder eine der in Tabelle 1 dargestellten Aktivitäten hat. Zur Bestimmung, ob ein SES-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend in Beispiel 8 des Beispiels teils beschrieben, sind dem Fachmann geläufig.

Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte eines SES-Proteins codieren, lassen sich durch Isolieren eines Abschnitts von einer der Sequenzen in Anhang B, Exprimieren des codierten Abschnitts des SES-Proteins oder -Peptides (z.B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen der Aktivität des codierten Abschnittes des SES-Proteins oder -Peptides herstellen.

Die Erfindung umfaßt zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen (und Abschnitten davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden

36

- und somit das gleiche SES-Protein codieren wie dasjenige, das von den in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen codiert wird. In einer anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit
- 5 einer in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenz codiert. In einer weiteren Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B (codiert von einem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster) im wesentlichen homolog ist.
- 10 Zusätzlich zu den in Anhang A gezeigten *C. glutamicum*-SES-Nukleotidsequenzen, ist dem Fachmann bekannt, daß DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen von SES-Proteinen führen, innerhalb einer Population (bspw. der *C. glutamicum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im SES-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leseraster, das ein SES-
- 15 Protein, vorzugsweise ein *C. glutamicum*-SES-Protein, codiert. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1-5% in der Nukleotidsequenz des SES-Gens. Sämtliche Nukleotidvariationen und daraus resultierenden Aminosäurepolymorphismen in SES, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von SES-Proteinen nicht verändern, sollen im
- 25 Umfang der Erfindung liegen.
- Nukleinsäuremoleküle, die natürlichen Varianten entsprechen, und Nicht-*C. glutamicum*-Homologa der erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-
- 30 SES-cDNA können aufgrund ihrer Homologie zur hier offenbarten *C. glutamicum*-SES-Nukleinsäure mit der *C. glutamicum*-cDNA oder einem Abschnitt davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. In einer anderen Ausführungsform ist folglich
- 35 ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. In anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 30, 50, 100, 250 Nukleotide lang oder länger. Der Begriff
- 40 "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie er hier verwendet wird, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60% homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, daß Sequenzen, die mindestens
- 45 etwa 65%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75% oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringen-

37

ten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. finden. Ein bevorzugtes, nicht-einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist eine Hybridisierung in 6x Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 50-65°C. Ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz aus Anhang A hybridisiert, entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (bspw. ein natürliches Protein codiert). Bei einer Ausführungsform codiert die Nukleinsäure ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-SES-Protein.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der SES-Sequenz, die in der Population existieren können, ist der Fachmann sich ebenfalls bewußt darüber, daß Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz von Anhang A eingebracht werden können, was zur Änderung der Aminosäuresequenz des codierten SES-Proteins führt, ohne daß die Funktionsfähigkeit des SES-Proteins beeinträchtigt wird. Bspw. lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz von Anhang A herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest ist ein Rest, der sich in der Wildtypsequenz von einem der SES-Proteine (Anhang B) verändern läßt, ohne daß die Aktivität des SES-Proteins verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die SES-Proteinaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste jedoch (bspw. nicht-konservierte oder lediglich semikonservierte Aminosäurereste in der Domäne mit SES-Aktivität) können für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne daß die SES-Aktivität verändert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft folglich Nukleinsäuremoleküle, die SES-Proteine codieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die SES-Aktivität nicht-essentiell sind. Diese SES-Proteine unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in Anhang B, behalten aber dennoch mindestens eine der hier beschriebenen SES-Aktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfaßt bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein codiert, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die mindestens etwa 50% Homologie zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweist und an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Pro-

38

teinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 gezeigten Aktivitäten besitzt. Das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein weist vorzugsweise mindestens etwa 50-60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 60-70%, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95%, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98% oder 99% Homologie zu einer der Sequenzen in Anhang B auf.

- 10 Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (bspw. einer der Sequenzen aus Anhang B und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen für optimale Vergleichszwecke untereinander geschrieben (bspw. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, damit ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure erzeugt wird). Die Aminosäurereste oder die Nukleotide werden dann an den entsprechenden Aminosäure- oder Nukleotidpositionen miteinander verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (bspw. einer der Sequenzen von Anhang B) vom gleichen Aminosäurerest oder Nukleotid belegt wird, wie an der entsprechenden Stelle in der anderen Sequenz (bspw. einer mutanten Form der aus Anhang B ausgewählten Sequenz), dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. der hier verwendete Begriff Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie" ist äquivalent zu Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl der identischen Positionen in allen Sequenzen (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Positionen / Gesamtanzahl der Positionen x 100).
- 30 Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ein SES-Protein codiert, das zu einer Proteinsequenz aus Anhang B homolog ist, kann durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz aus Anhang
- 35 A erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingebracht werden. Die Mutationen können in eine der Sequenzen aus Anhang A durch Standard-Techniken, wie stellergerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vor-
- 40 zugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einem oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäurereste eingeführt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest durch einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von
- 45 Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Aspa-

39

- raginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), nicht-polaren Seitenketten, (bspw. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-
- 5 verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einem SES-Protein wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. In einer weiteren Ausführungsform können die Mutationen
- 10 alternativ zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der SES-codierenden Sequenz eingebracht werden, bspw. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können auf eine hier beschriebene SES-Aktivität untersucht werden, um Mutanten zu
- 15 identifizieren, die eine SES-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese von einer der Sequenzen aus Anhang A kann das codierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann bspw. mit den hier beschriebenen Tests (siehe Beispiel 8 des Beispielteils) bestimmt werden.
- 20
- Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, die die vorstehend beschriebenen SES-Proteine codieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die antisense dazu sind. Eine "Antisense-"Nukleinsäure umfaßt eine Nukleotidsequenz,
- 25 die zu einer "Sense-"Nukleinsäure, welche ein Protein codiert, komplementär ist, bspw. komplementär zum codierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten SES-codierenden Strang
- 30 oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "codierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die ein SES-Protein codiert. Der Begriff "codierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfaßt, die in Aminosäurereste translatiert werden (bspw. umfaßt der gesamte codierende Bereich von SEQ.-ID. RXA00005 die Nukleotide 1 bis 1608). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "nicht-co-
- 35 dierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die SES codiert. Der Begriff "nicht-codierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den codierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet werden).
- 40
- 45

40

Bei den hier offenbarten Sequenzen des codierenden Stranges, die das SES codieren (bspw. die Sequenzen aus Anhang A), können die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren gemäß der Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung ausgestaltet werden. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zum gesamten codierenden Bereich von SES-mRNA komplementär sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das zu lediglich einem Abschnitt des codierenden oder nicht-codierenden Bereichs der SES-mRNA antisense ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann bspw. zum Bereich, der die Translationsstartstelle von SES-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann bspw. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann durch chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (bspw. ein Antisense-Oligonukleotid) kann chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Bspw. können Phosphorothioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Iso-pentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann ersatzweise biologisch hergestellt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Zielnukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).

41

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die ein SES-Protein codiert, hybridisieren oder daran binden, so daß die

5 Expression des Proteins, bspw. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotid-Komplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder bspw. im Fall eines Antisense-Nukleinsäuremoleküls, das DNA-Duplexes bindet, durch spezifische Wechselwirkungen

10 in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert werden, daß es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein Antigen bindet, das auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiert wird, bspw. durch Verknüpfen des Antisense-Nukleinsäuremoleküls mit einem Peptid oder einem Antikörper,

15 das/der an einen Zelloberflächenrezeptor oder Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann auch unter Verwendung der hier beschriebenen Vektoren an Zellen verabreicht werden. Zur Erzielung hinreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken prokaryotischen, viralen oder eukaryotischen Promotors befindet, bevorzugt.

In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das

25 Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-O-Methylribonukleotid (Inoue et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.

35 In einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, zu der sie einen komplementären Bereich haben, spalten können. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von SES-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation der SES-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine SES-codierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbarten SES-cDNA (d.h. RXA00003 in Anhang A) gestaltet werden.

45 Bspw. kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär

tär zur Nukleotidsequenz ist, die in einer SES-codierenden mRNA gespalten werden soll. S. bspw. Cech et al., US-Patent Nr. 4 987 071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5 116 742. Alternativ kann SES-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit spezifischer
5 Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe bspw. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418.

Die SES-Genexpression läßt sich alternativ hemmen, indem Nukleo-
10 tidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer SES-Nukleotidsequenz sind (bspw. zu einem SES-Promotor und/oder -Enhancer) so dirigiert werden, daß Triple-Helixstrukturen gebildet werden, die die Transkription eines SES-Gens in Ziel-Zellen verhindern. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug
15 Res. 6(6) 569-584; Helene, C. et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27-36; und Maher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-815.

B. Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen

20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die ein SES-Protein (oder einen Abschnitt davon) codieren. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es
25 gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer
30 Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (bspw. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugetiervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugetiervektoren) werden in das Genom einer Wirtszelle beim Einbringen in die Wirtszelle integriert und da-
35 durch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben die Expressionsvektoren, die bei DNA-Rekombinationstechniken verwendet wer-
40 den können, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch andere Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (bspw. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und
45 adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen.

43

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren umfassen eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, d.h. daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere regulatorische Sequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, umfassen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden sind. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", daß die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die regulatorische(n) Sequenz(en) gebunden ist, daß die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist (bspw. in einem in-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht ist). Der Begriff "regulatorische Sequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (bspw. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese regulatorischen Sequenzen sind bspw. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatorische Sequenzen umfassen solche, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen steuern. Der Fachmann ist sich dessen bewußt, daß die Gestaltung eines Expressionsvektors von Faktoren abhängen kann, wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem gewünschten Ausmaß der Proteinexpression usw. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in die Wirtszellen eingebracht werden, so daß dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich der Fusionsproteine oder -peptide, die von den Nukleinsäuren, wie hier beschrieben, codiert werden, hergestellt werden (bspw. SES-Proteine, mutierte Formen von SES-Proteinen, Fusionsproteine, usw.).

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von SES-Proteinen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet sein. Bspw. können SES-Gene in bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (mit Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A. et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. in: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F. et al., Hrsg, S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algenzellen und Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of

Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.: 583-586) oder Säugetierzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden weiter erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, bspw. mit regulatorischen Sequenzen des T7-Promotors und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, die die Expression von Fusions- oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren steuern eine Reihe von Aminosäuren zu einem darin codierten Protein, gewöhnlich am Aminoterminal des rekombinanten Proteins, bei. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins; und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so daß die Trennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Übliche Fusionsexpressionsvektoren umfassen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die codierende Sequenz des SES-Proteins in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so daß ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein codiert, umfassend vom N-Terminus zum C-Terminus: GST - Thrombin-Spaltstelle - X-Protein. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Das rekombinante SES-Protein, das nicht mit GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

Beispiele geeigneter induzierbarer Nicht-Fusions-*E.-coli*-Expressionsvektoren umfassen pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression aus dem pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase

45

von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale

- 5 Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL 21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen geliefert, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.
- 10 Eine Strategie zur Maximierung der Expression des rekombinanten Proteins ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien
- 15 (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so daß die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden (Wada et
- 20 al. (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118). Diese Veränderung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen kann durch Standard-DNA-Synthesetechniken erfolgen.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der SES-Protein-Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA).
- 30 Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of Fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.
- 35

- Alternativ können die erfindungsgemäßen SES-Proteine in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).
- 40

46

In einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen SES-Proteine in Zellen einzelliger Pflanzen (wie Algen) oder in Pflanzenzellen höherer Pflanzen (bspw. Spermatophyten, wie Feldfrüchte) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Bekker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721.

In einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in Säugetierzellen mit einem Säugetier-Expressionsvektor exprimiert. Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6:187-195). Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressionsvektors oft von viralen regulatorischen Elementen bereitgestellt. Gemeinhin verwendete Promotoren stammen bspw. aus Polyoma, Adenovirus 2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform kann der rekombinante Säugetier-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp bewirken (bspw. werden gewebespezifische regulatorische Elemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische regulatorische Elemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht-einschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren umfassen den Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277), lymphoid-spezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8:729-733) und Immunglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33:741-748), neuronenspezifische Promotoren (bspw. der Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddie (1989) PNAS 86:5473-5477), pankreasspezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230:912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren (bspw. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4 873 316 und europäische Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 264 166). Entwicklungsregulierte Promotoren sind ebenfalls umfaßt, bspw. die Maus-hox-Promotoren (Kessel und Gruss (1990) Science 249:374-379) und der

47

α -Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546).

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor
5 bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. D.h. daß das DNA-Molekül derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden ist, daß die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur SES-mRNA antisense
10 ist, möglich wird. Es können regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig an eine in Antisense-Richtung klonierte Nukleinsäure gebunden sind und die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, bspw. können virale Promotoren und/oder Enhancer oder
15 regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines
20 hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt wird, in den der Vektor eingebracht wird. Für eine Diskussion der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen siehe Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews -
25 Trends in Genetics, Bd. 1(1) (1986).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle"
30 zelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Es ist selbstverständlich, daß diese Begriffe nicht nur eine bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle betreffen. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch im Umfang des
35 Begriffs, wie er hier verwendet wird, noch umfaßt.

Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle
40 sein. Bspw. kann ein SES-Protein in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Hefe- oder Säugetierzellen (wie Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder COS-Zellen) exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig. Mikroorganismen, die mit *Corynebacterium glutamicum* verwandt sind
45 und sich geeignet als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Nu-

kleinsäure- und Proteinmoleküle verwenden lassen, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Durch herkömmliche Transformations- oder Transfektionsverfahren
5 läßt sich Vektor-DNA in prokaryotische oder eukaryotische Zellen einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", "Konjugation" und "Transduktion", wie sie hier verwendet werden, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (bspw. DNA) in eine Wirts-
10 zelle umfassen, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelter Transfektion, Lipofektion, natürlicher Kompetenz, chemisch vermittelter Übertragung oder Elektroporation. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen lassen sich nachlesen in Sam-
15 brook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern.

20 Es ist bekannt, daß für die stabile Transfektion von Säugetierzellen je nach dem verwendeten Expressionsvektor und der verwendeten Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integrieren kann. Zur Identifizierung und Selektion dieser Integranten wird gewöhnlich ein Gen, das einen
25 selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) codiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selektierbare Marker umfassen solche, die die Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen. Eine Nukleinsäure, die einen selektierbaren Mar-
30 ker codiert, kann in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derjenige, der ein SES-Protein codiert, oder kann auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können bspw. durch Medikamentenselektion identifiziert wer-
35 den (z.B. überleben Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, wohingegen die anderen Zellen sterben).

Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines SES-
40 Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um das SES-Gen zu verändern, bspw. funktionell zu disruptieren. Dieses SES-Gen ist vorzugsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-SES-Gen, jedoch kann ein Homologon von einem verwandten Bakterium oder sogar aus einer Säugetier-, Hefe-
45 oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor derart ausgestaltet, daß das endogene SES-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert ist

49

(d.h. nicht länger ein funktionelles Protein codiert; auch als "Knockout"-Vektor bezeichnet). Der Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene SES-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen SES-Proteins verändert wird.). Der veränderte Abschnitt des SES-Gens ist im homologen Rekombinationsvektor an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure des SES-Gens flankiert, die eine homologe Rekombination zwischen dem exogenen SES-Gen, das von dem Vektor getragen wird, und einem endogenen SES-Gen in einem Mikroorganismus ermöglicht. Die zusätzliche flankierende SES-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich enthält der Vektor mehrere Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z.B. Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503 für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus (z.B. durch Elektroporation) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte SES-Gen mit dem endogenen SES-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet bekannter Verfahren selektiert.

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Mikroorganismen produziert werden, die ausgewählte Systeme enthalten, die eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen. Der Einschluß eines SES-Gens in einen Vektor, wodurch es unter die Kontrolle des Lac-Operons gebracht wird, ermöglicht z.B. die Expression des SES-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese regulatorischen Systeme sind im Fachgebiet bekannt.

Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle in Kultur, kann zur Produktion (d.h. Expression) eines SES-Proteins verwendet werden. Die Erfindung stellt zudem Verfahren zur Produktion von SES-Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der ein SES-Protein codiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das ein Wildtyp- oder verändertes SES-Protein codiert) in einem geeigneten Medium, bis das SES-Protein produziert worden ist. Das Verfahren umfaßt in einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der SES-Proteine aus dem Medium oder der Wirtszelle.

C. Isolierte SES-Proteine

- Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte SES-Proteine und biologisch aktive Abschnitte davon. Ein "isoliertes" oder
- 5 "gereinigtes" Protein oder biologisch aktiver Abschnitt davon ist im wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im wesentlichen frei von zellulärem Material"
- 10 umfaßt SES-Proteinpräparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombinant produziert wird, abgetrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Ausdruck "im wesentlichen frei von zellulärem Material" SES-Proteinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen
- 15 auf das Trockengewicht) Nicht-SES-Protein (hier auch als "kontaminierendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% Nicht-SES-Protein. Das SES-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon enthält
- 20 nach rekombinanter Produktion ebenfalls vorzugsweise im wesentlichen kein Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20%, stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen
- 25 oder anderen Chemikalien" umfaßt SES-Proteinpräparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien abgetrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Begriff "im wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" SES-Pro-
- 30 teinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf das Trockengewicht), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% chemische Vorstufen oder Nicht-SES-Chemikalien. In bevorzugten Ausführungsformen weisen die isolierten Proteine oder
- 35 biologisch aktiven Abschnitte davon keine kontaminierenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem das SES-Protein stammt. Diese Proteine werden gewöhnlich durch rekombinante Expression, bspw. eines *C. glutamicum*-SES-Proteins, in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*, hergestellt.
- 40
- Ein erfindungsgemäßes isoliertes SES-Protein oder ein Abschnitt davon kann an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Protein-
- 45 sekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen oder hat eine oder mehrere der in Tabelle 1 gezeigten Aktivitäten. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das Protein oder ein Abschnitt davon

51

- eine Aminosäuresequenz, die zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B hinreichend homolog ist, daß das Protein oder der Abschnitt davon die Fähigkeit, an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilzunehmen, beibehält. Der Abschnitt des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Abschnitt, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes SES-Protein
- 5 Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilzunehmen, beibehält. Der Abschnitt des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Abschnitt, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes SES-Protein
- 10 eine der in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenzen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das SES-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz aus Anhang A hybridisiert. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das SES-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird und die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen von Anhang B ist. Die bevorzugten erfindungsgemäßen SES-Proteine besitzen vorzugsweise ebenfalls mindestens eine der hier beschriebenen SES-Aktivitäten. Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes SES-Protein umfaßt zum Beispiel eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw.
- 25 unter stringenten Bedingungen, mit einer Nukleotidsequenz von Anhang A hybridisiert, und die an der Reparatur oder Rekombination von DNA, Transposition von genetischem Material, Genexpression (d. h. Transkriptions- oder Translationsprozessen), Proteinfaltung oder Proteinsekretion in *Corynebacterium glutamicum* teilnehmen kann oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 gezeigten Aktivitäten hat.

- Bei weiteren Ausführungsformen ist das SES-Protein im wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B und behält
- 35 die funktionelle Aktivität des Proteins mit einer der Sequenzen aus Anhang B und unterscheidet sich dennoch in der Aminosäuresequenz aufgrund von natürlicher Variation oder Mutagenese, wie in Unterabschnitt I oben eingehend beschrieben. In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das SES-Protein folglich eine Aminosäuresequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist und die zumindest eine der hier beschriebenen SES-
- 45 Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das im wesent-

lichen homolog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist.

- Biologisch aktive Abschnitte eines SES-Proteins umfassen Peptide mit Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz eines SES-Proteins hergeleitet sind, bspw. eine in Anhang B gezeigte Aminosäuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einem SES-Protein homolog ist, die weniger Aminosäuren als das Vollängen-SES-Protein oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einem SES-Protein homolog ist, und zumindest eine Aktivität eines SES-Proteins aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Abschnitte (Peptide, bspw. Peptide, die bspw 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität eines SES-Proteins. Überdies können andere biologisch aktive Abschnitte, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombinante Techniken hergestellt werden und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Abschnitte eines SES-Proteins umfassen vorzugsweise ein oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Abschnitte davon mit biologischer Aktivität.

- SES-Proteine werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Bspw wird. ein Nukleinsäuremolekül, das das Protein codiert, in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und das SES-Protein wird in der Wirtszelle exprimiert. Das SES-Protein kann dann durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Proteinreinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann ein SES-Protein, -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann natives SES-Protein aus Zellen (bspw. Endothelzellen, Bakterienzellen, Pilzzellen oder anderen Zellen), z.B. mit einem Anti-SES-Antikörper, isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei ein erfindungsgemäßes SES-Protein oder ein Fragment davon verwendet wird.

- Die Erfindung stellt auch chimäre SES-Proteine oder SES-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfaßt ein "chimäres SES-Protein" oder "SES-Fusionsprotein" ein SES-Polypeptid, das funktionsfähig an ein Nicht-SES-Polypeptid gebunden ist. Ein "SES-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, die einem SES-Protein entspricht, wohingegen ein "Nicht-SES-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das nicht im wesentlichen homolog zum

53

- SES-Protein ist, z.B. ein Protein, das sich vom SES-Protein unterscheidet und vom gleichen oder einem anderen Organismus herrührt. Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, daß das SES-Polypeptid und das Nicht-SES-Polypeptid im Leseraster miteinander fusioniert sind. Das Nicht-SES-Polypeptid kann an den N- oder C-Terminus des SES-Polypeptides gebunden sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein bspw. ein GST-SES-Fusionsprotein, bei dem die SES-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenzen gebunden sind. Diese Fusionsproteine können die Reinigung des rekombinanten SES-Proteins erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein ein SES-Protein, das eine heterologe Signalsequenz an seinem N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säugetier-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion eines SES-Proteins durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.

- Ein erfindungsgemäßes chimäres SES-Protein oder SES-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken produziert. DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen codieren, werden gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, bspw. durch Einsatz glatter oder überhängender Enden zur Ligation, Restriktionsenzymsspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, falls erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligierung. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten mittels Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen. Diese können anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden, so daß eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (s. bspw. Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., Hrsg., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die schon eine Fusionseinheit codieren (bspw. ein GST-Polypeptid). Eine SES-codierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so daß die Fusionseinheit mit dem SES-Protein im Leseraster verbunden ist.

- Homologa des SES-Proteins können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch bestimmte Punktmutation oder Verkürzung des SES-Proteins. Der Begriff "Homologon", wie er hier verwendet wird, betrifft eine variante Form des SES-Proteins, die als Agonist oder Antagonist der SES-Protein-Aktivität wirkt. Ein Agonist des SES-Proteins kann im wesentlichen die gleiche oder einen Teil der biologischen Aktivitäten des SES-Proteins beibehalten. Ein Anta-

gonist des SES-Proteins kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form des SES-Proteins bspw. durch kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element einer biochemischen Kaskade, die das SES-Protein enthält, hemmen, 5 indem er an ein Zielmolekül bindet, mit dem das SES-Protein interagiert, so daß keine funktionelle Wechselwirkung möglich ist, oder indem er direkt an das SES-protein bindet und dessen normale Aktivität hemmt.

- 10 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologa des SES-Proteins durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, bspw. Verkürzungsmutanten, des SES-Proteins bezüglich SES-Protein-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Ausführungsform wird eine variierte Bank von
- 15 SES-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt und von der variierten Genbank codiert. Eine variierte Bank von SES-Varianten kann bspw durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide in Gensequenzen hergestellt werden, so daß sich ein degenerierter Satz
- 20 potentieller SES-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. Für Phagen-Display), die diesen Satz von SES-Sequenzen enthalten, exprimieren läßt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller SES-Homologa aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Synthesautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung
- 25 sämtlicher Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen SES-Sequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (s. bspw. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science
- 30 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

- Zusätzlich können Banken von Fragmenten der SES-Protein-Codierung verwendet werden, um eine variierte Population von SES-Fragmenten zum Screening und zur anschließenden Selektion von Homologa
- 40 eines SES-Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform kann eine Bank von codierenden Sequenzfragmenten durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer codierenden SES-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA,
 - 45 die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu ge-

55

bildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuclease und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor erzeugt werden. Durch dieses Verfahren kann eine Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne
5 Fragmente mit verschiedenen Größen des SES-Proteins codiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken hinsichtlich Genprodukten mit einer ausgewählten Eigenschaft bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von SES-Homologa erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit
10 hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren geeigneter Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen
15 codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert. Recursive-Ensemble-Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um SES-Homologa zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS
20 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3):327-331).

Bei einer weiteren Ausführungsform können Tests auf Zellenbasis zur Analyse einer variierten SES-Bank unter Verwendung von im
30 Fachgebiet bekannten Verfahren verwendet werden.

D. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Proteinhomologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können
35 in einem oder mehreren nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *C. glutamicum* und verwandten Organismen, Kartierung von Genomen von Organismen, die mit *C. glutamicum* verwandt sind, Identifikation und Lokalisation von *C. glutamicum*-Sequenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von SES-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation der Aktivität eines SES-Proteins; und Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie.
40

45

56

Die erfindungsgemäßen SES-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendungen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Corynebacterium glutamicum* oder naher Verwandter davon verwendet werden. Sie können zudem zur Identifikation
5 des Vorliegens von *C. glutamicum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikroorganismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *C. glutamicum*-Genen bereit. Durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Popu-
10 lation von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich eines *C. glutamicum*-Gens überspannt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus zugegen ist. *Corynebacterium glutamicum* selbst ist zwar nicht pathogen, jedoch ist es mit pathogenen Arten, wie
15 *Corynebacterium diphtheriae*, verwandt. Der Nachweis eines solchen Organismus ist von signifikanter klinischer Bedeutung.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle können ferner als marker für bestimmte Bereiche des Genoms dienen. Dies
20 eignet sich nicht nur zum Kartieren des Genoms, sondern auch für funktionelle Studien von *C. glutamicum*-Proteinen. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes *C. glutamicum*-DNA-bindendes Protein bindet, kann das *C. glutamicum*-Genom bspw. gespalten und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert
25 werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden; die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisation des Fragmentes auf der genomischen Karte
30 von *C. glutamicum*, und wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, erleichtert es eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem hinreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, so daß diese Nukleinsäuremoleküle als Marker zur Konstruktion einer genomischen Karte
35 in verwandten Bakterien (z.B. *Brevibacterium lactofermentum*) dienen können.

Die erfindungsgemäßen SES-Nukleinsäuremoleküle eignen sich ebenfalls für Evolutions- und Proteinstruktur-Untersuchungen. Die
40 Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden von einer Vielzahl von prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ausgenutzt; durch Vergleich der Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen codieren, kann
45 der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung,

welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung solcher Bereiche des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteintechnologie-Untersuchungen wertvoll und kann
5 einen Hinweis darauf geben, wieviel Mutagenese das Protein tolerieren kann ohne die Funktion zu verlieren.

Die Manipulation der erfindungsgemäßen SES-Nukleinsäuremoleküle kann die Produktion von SES-Proteinen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-SES-Proteinen bewirken. Diese Proteine
10 können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität verbessert werden, können in größerer Anzahl als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein oder können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität geschwächt sein.

15

Diese Modulation der Aktivität von Proteinen, die an der DNA-Reparatur, Rekombination oder Transposition in *C. glutamicum* beteiligt sind, sollte die genetische Stabilität der Zelle beeinflussen. Beispielsweise kann man durch Verringern der Anzahl oder Aktivität von Proteinen, die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt
20 sind, die Fähigkeit der Zelle, genetische Fehler zu korrigieren, verringern, was das einfachere Einbringen gewünschter Mutationen in das Genom (wie solchen, die an der Feinchemikalienproduktion beteiligte Proteine codieren) ermöglichen sollte. Die Steigerung
25 der Aktivität oder Anzahl von Transposons sollte ebenso zu einer erhöhten Mutationsrate im Genom führen und kann die leichte Verdopplung gewünschter Gene (bspw. solcher, die an der Feinchemikalienproduktion beteiligte Proteine codieren) oder Disruption unerwünschter Gene (z.B. solcher, die Feinchemikalien-Abbauproteine
30 codieren) möglich machen. Dagegen kann es durch Verringern der Anzahl oder Aktivität von Transposons oder Erhöhen der Anzahl oder Aktivität von DNA-Reparaturproteinen möglich sein, die genetische Stabilität von *C. glutamicum* zu erhöhen, was wiederum zur
35 besseren Aufrechterhaltung eingebrachter Mutationen in diesen Mikroorganismen durch mehrere Generationen in Kultur führen sollte. Idealerweise wird während der Mutagenese und Stammkonstruktion die Aktivität eines oder mehrerer DNA-Reparatursysteme verringert und die Aktivität eines oder mehrerer Transposons erhöht, aber wenn die gewünschte Mutation in dem Stamm erzielt worden ist,
40 tritt das Gegenteil auf. Diese Manipulation ist möglich, indem ein oder mehrere DNA-Reparaturgene oder Transposons unter die Kontrolle eines induzierbaren Repressors gestellt wird/werden.

Die Modulation von an der Transkription und Translation in *C. glutamicum* beteiligten Proteinen kann direkte und indirekte Wirkungen auf die Produktion einer Feinchemikalien von diesen Mikroorganismen haben. Beispielsweise ist es durch Manipulation eines
45

- Proteins, das direkt ein Gen translatiert (z.B. einer Polymerase) oder direkt die Transkription reguliert (eines Repressor- oder Aktivatorproteins) möglich, die Expression des Zielgens direkt zu beeinflussen. Bei Genen, die ein Protein codieren, das an der
- 5 Biosynthese oder am Abbau einer Feinchemikalie beteiligt ist sollte dieser Typ der genetischen Manipulation eine direkte Wirkung auf die Produktion dieser Feinchemikalie haben. Die Mutagenese eines Repressorproteins, so daß es sein Zielgen nicht länger reprimieren kann, oder die Mutagenese eines Aktivatorproteins, so
- 10 daß seine Aktivität optimiert wird, sollte zu einer erhöhten Transkription des Zielgens führen. Ist das Zielgen z.B. ein Feinchemikalienbiosynthesegen, kann eine erhöhte Produktion dieser Chemikalie aufgrund der insgesamt größeren Anzahl an für vorliegenden Transkripten dieses Gens resultieren, was ebenfalls zu ei-
- 15 ner vergrößerten Anzahl des Proteins führen sollte. Die Erhöhung der Anzahl oder Aktivität eines Repressorproteins für eine Zielsequenz oder die Verringerung der Anzahl oder Aktivität eines Aktivatorproteins für eine Zielsequenz sollte, wenn diese Sequenz bspw. ein Feinchemikalien-Abbauprotein ist, zu einer ähnlichen
- 20 Steigerung der Produktion der Feinchemikalie führen.

- Auch indirekte Wirkungen auf die Feinchemikalienproduktion können aus der Manipulation von Proteinen, die an der Transkription und Translation beteiligt sind, hervorgehen. Durch die Modulation der
- 25 Aktivität oder Anzahl von Transkriptionsfaktoren (z.B. der Sigma-Faktoren) oder von Translationsrepressoren/-aktivatoren, die die Transkription in *C. glutamicum* in Reaktion auf Umwelt- oder Stoffwechselfaktoren global regulieren, sollte es möglich sein, die zelluläre Transkription von der Umwelt- oder Stoffwechselre-
- 30 gulation abzukoppeln. Dies könnte wiederum eine kontinuierliche Transkription unter Bedingungen ermöglichen, die gewöhnlich die Genexpression verlangsamen oder beenden würden, wie ungünstigen Bedingungen (z.B. hohe Temperatur, niedriger Sauerstoffgehalt, hoher Spiegel an Abfallprodukten), die in einer Fermenterkultur
- 35 im Großmaßstab vorliegen. Durch Erhöhen der Rate der Expression des Gens (z.B. Feinchemikalienbiosynthesegens) in diesen Situationen kann auch, zumindest aufgrund der vergleichsweise größeren Anzahl der Feinchemikalienbiosyntheseproteine in der Zelle, die Gesamtrate der Feinproduktproduktion erhöht werden. Prinzipien
- 40 und Beispiele für die Modifikation der Transkriptions- und Translationsregulation sind beschrieben in z.B. Lewin, B. (1990) Genes IV, Teil 3: "Controlling procaryotic genes by transcription", Oxford Univ. Press: Oxford, S. 213-301.
- 45 Die Modulation der Aktivität oder Anzahl von Proteinen, die an der Polypeptidfaltung beteiligt sind (z.B. Chaperone) kann insgesamt die Erhöhung der Produktion korrekt gefalteter Moleküle in

59

der Zelle ermöglichen. Dies hat zwei Auswirkungen: zunächst insgesamt eine Erhöhung der Anzahl an Proteinen in der Zelle aufgrund der Tatsache, daß weniger Proteine falsch gefaltet und abgebaut werden und, zweitens, eine Erhöhung der Anzahl eines gegebenen Proteins, das korrekt gefaltet und somit aktiv ist (s. z.B. Thomas, J.G., Baneyx, F. (1997) Protein Expression and Purification 11(3):289-296; Luo, Z.H., und Hua, Z.C. (1998) Biochemistry and Molecular Biology International 46(3):471-477; Dale, G.E., et al. (1994) Protein Engineering 7(7):925-931; Amrein, K.E. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92(4):1048-1052 und Caspers, P., et al. (1994) Cell. Mol. Biol. 40(5):635-644). Solche Mutationen führen zwar zu einer Erhöhung der Anzahl aktiver Proteine jeder Art, aber wenn sie mit zusätzlichen Mutationen, die die Aktivität oder Anzahl von z.B. einem Feinchemikalienbiosyntheseprotein erhöhen, gekoppelt werden, kann eine additive Wirkung auf die Menge an korrekt gefaltetem aktivem gewünschtem Protein erhalten werden.

Die Manipulation von Proteinen, die an der Sekretion von Polypeptiden aus *C. glutamicum* beteiligt sind, so daß ihre Aktivität oder Anzahl verbessert ist, kann die Sekretion einer proteinarartigen Feinchemikalie (z.B. eines Enzyms) aus diesem Mikroorganismus direkt verbessern. Es ist erheblich leichter, Feinchemikalien zu ernten und zu reinigen, wenn sie in das Medium einer Kultur im Großmaßstab sezerniert werden als wenn sie in der Zelle zurückgehalten werden, so daß die Ausbeute und Produktion einer Feinchemikalie durch diese Veränderung des Sekretionssystems erhöht werden sollte. Die genetischen Manipulationen dieser Sekretionsproteine kann auch zu direkten Verbesserungen der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien führen. Erstens kann die gesteigerte oder verringerte Aktivität eines oder mehrerer *C. glutamicum*-Sekretionssysteme (wie sie durch Mutagenese eines oder mehrerer SES-Proteine, die an diesen Wegen beteiligt sind, erzielt wird) zu insgesamt erhöhten oder verringerten Sekretionsraten aus der Zelle führen. Viele dieser sezernierten Proteine haben Funktionen, die für die Zellebensfähigkeit wichtig sind (z.B. Zelloberflächenproteasen oder -Rezeptoren). Eine Änderung des Sekretionswegs, so daß diese Proteine leichter an ihren extrazellulären Ort transportiert werden, kann die Gesamtlebensfähigkeit der Zelle erhöhen und somit zu höheren Zahlen an *C. glutamicum*-Zellen führen, die Feinchemikalien während eine Züchtung im Großmaßstab produzieren können. Zweitens spielen bestimmte bakterielle Sekretionssysteme (z.B. das sec-System) bekanntlich auch eine signifikante Rolle bei dem Prozeß, durch den integrale Membranproteinen (z.B. Kanäle, Poren oder Transporter) in die Zellmembran inserieren. Wird die Aktivität eines oder mehrerer Sekretionswegproteine gesteigert, kann die Fähigkeit der Zelle, Feinchemikalien zu pro-

duzieren, aufgrund des Vorliegens erhöhten intrazellulärer Nährstoffmengen oder verringerter Mengen an intrazellulären Abfallstoffen ebenfalls erhöht werden. Ist die Aktivität eines oder mehrerer dieser Sekretionswegproteine verringert, können nicht
5 genügend Nährstoffe zur Unterstützung der Überproduktion gewünschter Verbindungen vorhanden sein, oder Abfallprodukte können diese Biosynthese stören.

Diese vorstehend genannten Mutagenesestrategien für SES-Proteine,
10 die erhöhte Ausbeuten einer Feinchemikalie aus *C. glutamicum* bewirken sollen, sollen nicht einschränkend sein; Variationen dieser Mutagenesestrategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Unter Verwendung dieser Strategien und einschließlich der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwendet werden, um *C. glutamicum*-
15 oder verwandte Bakterienstämme, die mutierte SES-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, zu erzeugen, so daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Die gewünschte Verbindung
20 kann jedes von *C. glutamicum* hergestellte Produkt sein, einschließlich der Endprodukte von Biosynthesewegen und Zwischenprodukte natürlich vorkommender Stoffwechselwege sowie Moleküle, die im Metabolismus von *C. glutamicum* nicht natürlich vorkommen, die jedoch von einem erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-Stamm produziert
25 werden.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als einschränkend aufgefaßt werden sollen. Die Inhalte sämtlicher, in dieser Patentanmeldung zitierter Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichter Patentanmeldungen sind hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele

35

Beispiel 1: Präparation der gesamten genomischen DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Eine Kultur von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) wurde
40 über Nacht bei 30°C unter starkem Schütteln in BHI-Medium (Difco) gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 5ml Puffer I (5% des Ursprungsvolumens der Kultur - sämtliche angegebenen Volumina sind für 100 ml Kulturvolumen berechnet) resuspendiert.
45 Zusammensetzung von Puffer I: 140,34 g/l Saccharose, 2,46 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml/l KH_2PO_4 -Lösung (100g/l, mit KOH auf pH-Wert 6,7 eingestellt), 50 ml/l M12-Konzentrat (10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l

61

NaCl, 2 g/l MgSO₄ · 7 H₂O, 0,2 g/l CaCl₂, 0,5 g/l Hefe-Extrakt (Difco), 10 ml/l Spurenelemente-Mischung (200 mg/l FeSO₄ · H₂O, 10 mg/l ZnSO₄ · 7 H₂O, 3 mg/l MnCl₂ · 4 H₂O, 30 mg/l H₃BO₃, 20 mg/l CoCl₂ · 6 H₂O, 1 mg/l NiCl₂ · 6 H₂O, 3 mg/l Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 500 mg/l

5 Komplexbildner (EDTA oder Citronensäure), 100 ml/l Vitamingemisch (0,2 ml/l Biotin, 0,2 mg/l Folsäure, 20 mg/l p-Aminobenzoessäure, 20 mg/l Riboflavin, 40 mg/l Ca-Panthothenat, 140 mg/l Nikotinsäure, 40 mg/l Pyridoxolhydrochlorid, 200 mg/l Myo-Inositol). Lysozym wurde in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml zur Suspension gegeben. Nach etwa 4 Std. Inkubation bei 37°C wurde die Zellwand abgebaut, und die erhaltenen Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde einmal mit 5 ml Puffer I und einmal mit 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8) gewaschen. Das Pellet wurde in 4 ml TE-Puffer resuspendiert,

15 und 0,5 ml SDS-Lösung (10%) und 0,5 ml NaCl-Lösung (5 M) wurden zugegeben. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 µg/ml wurde die Suspension etwa 18 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol mittels Standard-Verfahren gereinigt. Dann wurde die DNA durch Zugabe von

20 1/50 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol, anschließender Inkubation für 30 min bei -20°C und 30 min Zentrifugation bei 12000 U/min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge mit einem SS34-Rotor (Sorvall) gefällt. Die DNA wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst,

25 der 20 µg/ml RNase A enthielt, und für mindestens 3 Std. bei 4°C gegen 1000 ml TE-Puffer dialysiert. Während dieser Zeit wurde der Puffer 3mal ausgetauscht. Zu Aliquots von 0,4 ml der dialysierten DNA-Lösung wurden 0,4 ml 2 M LiCl und 0,8 ml Ethanol zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die DNA durch

30 Zentrifugation gesammelt (13000 U/min, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland). Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst. Durch dieses Verfahren hergestellte DNA konnte für alle Zwecke verwendet werden, einschließlich Southern-Blotting oder zur Konstruktion genomischer Banken.

35

Beispiel 2: Konstruktion genomischer *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032)-Banken in *Escherichia coli*

Ausgehend von DNA, die wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt

40 wurde, wurden gemäß bekannter und gut eingeführter Verfahren (siehe bspw. Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) Cosmid- und Plasmid-Banken hergestellt.

45

Es ließ sich jedes Plasmid oder Cosmid einsetzen. Besondere Verwendung fanden die Plasmide pBR322 (Sutcliffe, J.G. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75:3737-3741); pACYC177 (Change & Cohen (1978) J. Bacteriol. 134:1141-1156); Plasmide der pBS-Reihe (pBSSK+, pBSSK- und andere; Stratagene, LaJolla, USA) oder Cosmide, wie SuperCos1 (Stratagene, LaJolla, USA) oder Lorist6 (Gibson, T.J. Rosenthal, A., und Waterson, R.H. (1987) Gene 53: 283-286.

10 Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computer-Funktionsanalyse

Genomische Banken, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung gemäß Standard-Verfahren, insbesondere dem Kettenabbruchverfahren mit ABI377-Sequenziermaschinen (s. z.B. Fleischman, R.D. et al. (1995) "Whole-genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus Influenzae Rd., Science 269:496-512) verwendet. Die Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet: 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3' oder 5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'.

20

Beispiel 4: In-vivo-Mutagenese

In vivo-Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* kann durchgeführt werden, indem eine Plasmid- (oder andere Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp. oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*) geschleust wird, die die Integrität ihrer genetischen Information nicht aufrechterhalten können. Übliche Mutatorstämme weisen Mutationen in den Genen für das DNA-Reparatursystem auf (z.B., mutHLS, mutD, mutT, usw., zum Vergleich siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms, in: *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist bspw. in Greener, A. und Callahan, M. (1994) Strategies 7:32-34 veranschaulicht.

35

Beispiel 5: DNA-Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

Mehrere *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten enthalten endogene Plasmide (wie bspw. pHM1519 oder pBL1) die autonom replizieren (für einen Überblick siehe bspw. Martin, J.F. et al. (1987) Biotechnology 5:137-146). Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* lassen sich leicht mittels Standard-Vektoren für *E. coli* konstruieren (Sambrook, J. et al., (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons), denen ein

63

Replikationsursprung für und ein geeigneter Marker aus *Corynebacterium glutamicum* beigegeben wird. Solche Replikationsursprünge werden vorzugsweise von endogenen Plasmiden entnommen, die aus *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten isoliert worden sind.

- 5 Besondere Verwendung als Transformationsmarker für diese Arten sind Gene für Kanamycin-Resistenz (wie solche, die vom Tn5- oder Tn-903-Transposon stammen) oder für Chloramphenicol (Winnacker, E.L. (1987) "From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology, VCH, Weinheim). Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur für die Herstellung einer großen Vielzahl von Shuttle-Vektoren, die in *E. coli* und *C. glutamicum* replizieren und für verschiedene Zwecke verwendet werden können, einschließlich Gen-Überexpression (siehe bspw. Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bacteriol. 162:591-597, Martin, J.F. et al., (1987) Biotechnology, 5:137-146 und Eikmanns, B.J. et al. (1992) Gene 102:93-98).

Mittels Standard-Verfahren ist es möglich, ein Gen von Interesse in einen der vorstehend beschriebenen Shuttle-Vektoren zu klonieren und solche Hybrid-Vektoren in *Corynebacterium glutamicum*-

- 20 Stämme einzubringen. Die Transformation von *C. glutamicum* läßt sich durch Protoplastentransformation (Kastsumata, R. et al., (1984) J. Bacteriol. 159:306-311), Elektroporation (Liebl, E. et al., (1989) FEMS Microbiol. Letters, 53:399-303) und in Fällen, 25 bei denen spezielle Vektoren verwendet werden, auch durch Konjugation erzielen (wie z.B. beschrieben in Schäfer, A., et (1990) J. Bacteriol. 172:1663-1666). Es ist ebenfalls möglich, die Shuttle-Vektoren für *C. glutamicum* auf *E. coli* zu übertragen, indem Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (mittels im Fachgebiet bekannter Standard-Verfahren) präpariert und in *E. coli* transformiert wird. Dieser Transformationsschritt kann mit Standard-Verfahren erfolgen, jedoch wird vorteilhafterweise ein Mcr-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, wie NM522 (Gough & Murray (1983) J. Mol. Biol. 166:1-19).

35

Beispiel 6: Bestimmung der Expression des mutanten Proteins

Die Beobachtungen der Aktivität eines mutierten Proteins in einer transformierten Wirtszelle beruhen auf der Tatsache, daß das mu-

- 40 tante Protein auf ähnliche Weise und in ähnlicher Menge expri-miert wird wie das Wildtyp-Protein. Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Transkriptionsmenge des mutanten Gens (ein Anzeichen für die mRNA-Menge, die für die Translation des Genprodukts verfügbar ist) ist die Durchführung eines Northern-Blots (s. 45 bspw. Ausubel et al., (1988) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley: New York), wobei ein Primer, der so ausgestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweis-

baren (gewöhnlich radioaktiven oder chemilumineszierenden) Markierung versehen wird, so daß - wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix übertragen und mit dieser Sonde inkubiert wird -
5 die Bindung und die Quantität der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge der mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information ist ein Hinweis auf das Ausmaß der Transkription des mutanten Gens. Gesamt-Zell-RNA läßt sich durch verschiedene Verfahren aus *Corynebacterium glutamicum* isolieren, die im Fachgebiet bekannt sind, wie in Bormann, E.R. et al., (1992) Mol. Microbiol. 6:317-326 beschrieben.

Zur Bestimmung des Vorliegens oder der relativen Menge an Protein, das von dieser mRNA translatiert wird, können Standard-
15 Techniken, wie Western-Blot, eingesetzt werden (s. bspw. Ausubel et al. (1988) "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York). Bei diesem Verfahren werden Gesamt-Zellproteine extrahiert, durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Matrix, wie Nitrocellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Antikörper, die an das gewünschte Protein spezifisch bindet, inkubiert,. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszierenden oder colorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen läßt. Das Vorliegen und die beobachtete Menge an Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gesuchten Mutanten-
25 proteins in der Zelle an.

Beispiel 7: Wachstum von genetisch verändertem *Corynebacterium glutamicum* - Medien und Anzuchtbedingungen

30 Genetisch veränderte *Corynebakterien* werden in synthetischen oder natürlichen Wachstumsmedien gezüchtet. Eine Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmedien für *Corynebakterien* sind bekannt und leicht erhältlich (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32:205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters 11:11-16; Patent DE 4 120 867; Liebl (1992) "The Genus
35 *Corynebacterium*", in: The Procaryotes, Bd. II, Balows, A., et al., Hrsg. Springer-Verlag). Diese Medien bestehen aus einer oder mehreren Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen, Vitaminen und Spurenelementen. Bevorzugte Kohlenstoff-
40 quellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind bspw. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte
45 der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Alkohole und organi-

65

- sche Säuren, wie Methanol, Ethanol, Essigsäure oder Milchsäure. Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas
- 5 oder Ammoniumsalze, wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere.
- 10 Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen. Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geei-
- 15 gnete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure. Die Medien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bspw. Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin
- 20 gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Me-
- 25 dienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion,
- 30 DIFCO) oder anderen.

- Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls ge-
- 35 trennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder chargenweise hinzugegeben werden.

- Die Anzuchtbedingungen werden für jedes Experiment gesondert definiert. Die Temperatur sollte zwischen 15°C und 45°C liegen und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen, und kann durch Zugabe von Puffern zu den Medien aufrechterhalten werden. Ein beispielhafter Puffer für
- 45 diesen Zweck ist ein Kaliumphosphatpuffer. Synthetische Puffer, wie MOPS, HEPES; ACES usw., können alternativ oder gleichzeitig verwendet werden. Der Anzucht-pH-Wert läßt sich während der An-

66

zucht auch durch Zugabe von NaOH oder NH_4OH konstant halten. Werden komplexe Medienkomponenten, wie Hefe-Extrakt, verwendet, sinkt der Bedarf an zusätzlichen Puffern, da viele komplexe Verbindungen eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Einsatz eines
5 Fermenters für die Anzucht von Mikroorganismen kann der pH-Wert auch mit gasförmigem Ammoniak reguliert werden.

Die Inkubationsdauer liegt gewöhnlich in einem Bereich von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Zeit wird so ausgewählt,
10 daß sich die maximale Menge Produkt in der Brühe ansammelt. Die offenbarten Wachstumsexperimente können in einer Vielzahl von Behältern, wie Mikrotiterplatten, Glasröhrchen, Glaskolben oder Glas- oder Metallfermentern unterschiedlicher Größen durchgeführt werden. Zum Screening einer großen Anzahl von Klonen sollten die
15 Mikroorganismen in Mikrotiterplatten, Glasröhrchen oder Schüttelkolben, entweder mit oder ohne Schikanen, gezüchtet werden. Vorzugsweise werden 100-ml-Schüttelkolben verwendet, die mit 10% (bezogen auf das Volumen) des erforderlichen Wachstumsmediums gefüllt sind. Die Kolben sollten auf einem Kreiselschüttler (Amplitude 25 mm) mit einer Geschwindigkeit im Bereich von 100-300 U/
20 min geschüttelt werden. Verdampfungsverluste können durch Aufrechterhalten einer feuchten Atmosphäre verringert werden; alternativ sollte für die Verdampfungsverluste eine mathematische Korrektur durchgeführt werden.

25 Werden genetisch modifizierte Klone untersucht, sollte auch ein unmodifizierter Kontrollklon oder ein Kontrollklon getestet werden, der das Basisplasmid ohne Insertion enthält. Das Medium wird auf eine OD_{600} von 0,5 - 1,5 angeimpft, wobei Zellen verwendet
30 werden, die auf Agarplatten, wie CM-Platten (10 g/l Glucose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Polypepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 22 g/l Agar pH-Wert 6,8 mit 2 M NaOH), die bei 30°C inkubiert worden sind, gezüchtet wurden. Das Animpfen der Medien erfolgt entweder durch Einbringen einer Kochsalzlösung von
35 *C. glutamicum*-Zellen von CM-Platten oder durch Zugabe einer flüssigen Vorkultur dieses Bakteriums.

Beispiel 8: In-vitro-Analyse der Funktion mutanter Proteine

40 Die Bestimmung der Aktivitäten und kinetischen Parameter von Enzymen ist im Fachgebiet gut bekannt. Experimente zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten veränderten Enzyms müssen an die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms angepaßt werden, was innerhalb der Fähigkeiten des Fachmann liegt. Überblicke über En-
45 zyme im allgemeinen sowie spezifische Einzelheiten, die die Struktur, Kinetiken, Prinzipien, Verfahren, Anwendungen und Beispiele zur Bestimmung vieler Enzymaktivitäten betreffen, können

- bspw. in den nachstehenden Literaturstellen gefunden werden: Dixon, M., und Webb, E.C: (1979) Enzymes, Longmans, London; Fersht (1985) Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, New York; Walsh (1979) Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman, San Francisco;
- 5 Price, N.C., Stevens, L. (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D: Hrsg. (1983) The Enzymes, 3. Aufl., Academic Press, New York; Bisswanger, H. (1994) Enzymkinetik, 2. Aufl. VCH, Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. Hrsg. (1983-1986) Methods
- 10 of Enzymatic Analysis, 3. Aufl. Bd. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) Bd. A9, "Enzymes", VCH, Weinheim, S. 352-363.

- Die Aktivität von Proteinen, die an DNA binden, kann durch viele
- 15 gut eingeführte Verfahren gemessen werden, wie DNA-Banden-Shift-Assays (die auch als Gelretardations-Assays bezeichnet werden). Die Wirkung dieser Proteine auf die Expression anderer Moleküle kann mit Reporter-Gen-Assays (wie in Kolmar, H. et al., (1995) EMBO J. 14:3895-3904 und den darin zitierten Literaturstellen be-
- 20 schrieben) gemessen werden. Reporter-Gen-Testsysteme sind wohl bekannt und für Anwendungen in pro- und eukaryotischen Zellen etabliert, wobei Enzyme, wie beta-Galactosidase, Grün-Fluoreszenz-Protein und mehrere andere verwendet werden.

- 25 Die Bestimmung der Aktivität von Membran-Transportproteinen kann gemäß Techniken, wie sie in Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 85-137; 199-234; und 270-322 beschrieben sind, erfolgen.

- 30 Beispiel 9: Analyse des Einflusses von mutiertem Protein auf die Produktion des gewünschten Produktes

- Die Wirkung der genetischen Modifikation in *C. glutamicum* auf die
- 35 Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Aminosäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten bezüglich der erhöhten Produktion des gewünschten Produktes (d.h.
- 40 einer Aminosäure) untersucht wird/werden. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann wohl bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (s. bspw.
- 45 Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques

- in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A. und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

- Zusätzlich zur Messung des Fermentationsendproduktes ist es ebenfalls möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-Effizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (bspw. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion gemeinsamer Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsg. IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und den darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Beispiel 10: Reinigung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Kultur

- Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Zellen oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kultur kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen.
- Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von den *C. glutamicum*-Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

69

- Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.
- 15 Im Fachgebiet sind viele Reinigungsverfahren bekannt, und das vorhergehende Reinigungsverfahren soll nicht einschränkend sein. Diese Reinigungstechniken sind bspw. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).
- 20 Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS,
- 25 Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27,
- 30 VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,
- 35 Bd. 17.

Äquivalente

- Der Fachmann erkennt oder kann - indem er lediglich Routineverfahren verwendet - viele Äquivalente der erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen. Diese Äquivalente sollen von den nachstehenden Patentansprüchen umfaßt sein.

Tabelle 1: Gene der Patentanmeldung

	ID #	Contig	NT Start	NT Stop	Funktion des Gens
5	RXN03038	VV0017	42941	43666	PS1 PROTEIN VORLAUFER
	RXN03039	VV0018	2	631	PS1 PROTEIN VORLAUFER
	RXN03040	VV0018	761	1069	PS1 PROTEIN VORLAUFER
	RXN03051	VV0022	2832	3566	PS1 PROTEIN VORLAUFER
	RXN03054	VV0026	1906	3486	PS1 PROTEIN VORLAUFER
10	RXN02949	VV0025	31243	31575	PREPROTEIN TRANSLOKASE SECE UNTER- EINHEIT
	RXN02462	VV0124	11932	13749	PREPROTEIN TRANSLOKASE SECA UNTER- EINHEIT
	RXN01559	VV0171	7795	5954	PROTEIN-EXPORT MEMBRANE PROTEIN SECD
	RXN00046	VV0119	5363	6058	Signal Erkennung partikel GTPase
15	RXN01863	VV0206	1172	24	/O/C Thioredoxin-ähnliche Oxidoreduktase
	RXN00833	VV0180	8039	8533	THIOL PEROXIDASE (EC 1.11.1.-)
	RXN01676	VV0179	12059	11304	THIOL:DISULFID AUSTAUSCH PROTEIN DSBD
	RXN00380	VV0223	836	216	THIOL:DISULFID AUSTAUSCH PROTEIN TLPA
	RXN00937	VV0079	42335	42706	THIOREDOXIN
	RXN02325	VV0047	5527	6393	THIOREDOXIN
20	RXN00493	VV0086	14389	16002	60 KD CHAPERONIN
	RXN02543	VV0057	22031	20178	DNAK PROTEIN
	RXN01345	VV0123	4883	3432	Molekulares chaperon (HSP70/DnaK Familie)
	RXN01837	VV0320	7103	7879	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE (EC 5.2.1.8)
	RXN01926	VV0284	1	741	PEPTID KETTE FREIGABE FACTOR 3
25	RXN02002	VV0111	141	518	PEPTID KETTE FREIGABE FACTOR 3
	RXN02736	VV0074	13600	14556	PUTATIVES OXPPZYKLUS PROTEIN OPCA
	RXN02280	VV0152	1849	26	TRAP1

30

35

40

45

Tabelle 2

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
A09073	ppg	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	Bachmann, B. et al. "DNA fragment coding for phosphoenolpyruvat carboxylase, recombinant DNA carrying said fragment, strains carrying the recombinant DNA and method for producing L-aminino acids using said strains," Patent: EP 0358940-A 3 03/21/90
A45579, A45581, A45583, A45585 A45587		Threonindehydratase	Moeckel, B. et al. "Production of L-isoleucine by means of recombinant micro-organisms with deregulated threonine dehydratase," Patent: WO 9519442-A 5 07/20/95
AB003132	murC; flsQ; flsZ		Kobayashi, M. et al. "Cloning, sequencing, and characterization of the flsZ gene from coryneform bacteria," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 236(2):383-388 (1997)
AB015023	murC; flsQ		Wachi, M. et al. "A murC gene from Coryneform bacteria," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 51(2):223-228 (1999)
AB018530	disR		Kimura, E. et al. "Molecular cloning of a novel gene, disR, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 60(10):1565-1570 (1996)
AB018531	disR1; disR2		
AB020624	murI	D-Glutamatracemase	
AB023377	tkl	Transketolase	
AB024708	gltB; gltD	Glutamin-2-oxoglutarataminotransferase große und kleine Untereinheiten	
AB025424	acn	Aconitase	
AB027714	rep	Replikationsprotein	
AB027715	rep; aad	Replikationsprotein; Aminoglycosid- adenyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF005242	argC	N-Acetylglutamat-5-semialdehyd- dehydrogenase	
AF005635	glnA	Glutaminsynthetase	
AF030405	hisF	Cyclase	
AF030520	argG	Argininosuccinatsynthetase	
AF031518	argF	Ornithincarbamolytransferase	
AF036932	aroD	3-Dehydroquinatedehydratase	
AF038548	pyc	Pyruvatcarboxylase	
AF038651	dcIAE; apt; rel	Dipeptid-bindendes Protein; Adenin- phosphoribosyltransferase; GTP- pyrophosphokinase	Wehmeier, L. et al. "The role of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> rel gene in (p)ppGpp metabolism," <i>Microbiology</i> , 144:1853-1862 (1998)
AF041436	argR	Arginine-Repressor	
AF045998	impA	Inositolmonophosphatphosphatase	
AF048764	argH	Argininosuccinatlase	
AF049897	argC; argJ; argB; argD; argF; argR; argG; argH	N-Acetylglutamylphosphatereductase; Ornithinacetyltransferase; N-Acetyl- glutaminkinase; Acetylornithin- trans- minase; Ornithin- carbamoyltransferase; Argininrepressor; Argininosuccinatsynthase; Argininosuccinatlase	
AF050109	inhA	Enoyl-acyl-Carrierprotein-Reductase	
AF050166	hisG	ATP-Phosphoribosyltransferase	
AF051846	hisA	Phosphoribosylformi- mino-5-amino-1-phosphoribosyl-4- imidazolecarboxamide isomerase	
AF052652	metA	Homoserin-O-acetyltransferase	Park, S. et al. "Isolation and analysis of metA, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Cells</i> , 8(3):286-294 (1998)
AF053071	aroB	Dehydrochinatsynthetase	
AF060558	hisH	Glutaminamidotransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF086704	hisE	Phosphoribosyl-ATP-pyrophosphohydrolase	
AF114233	aroA	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase	
AF116184	panD	L-Aspartat- α -decarboxylase-Vorstufe	Dusch, N. et al. "Expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> panD gene encoding L-aspartate- α -decarboxylase leads to pantothenate overproduction in <i>Escherichia coli</i> ," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 65(4)1530-1539 (1999)
AF124518	aroD; aroE	3-Dehydrochinase; Shikimatdehydrogenase	
AF124600	aroC; aroK; aroB; pepQ	Chorismatsynthase; Shikimatkinase; 3-Dehydrochinatsynthase; mutmaßliche Cytoplasmapeptidase	
AF145897	inhA		
AF145898	inhA		
AJ001436	ectP	Transport von Ectoine, Glycin, Betain, Prolin	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(22):6005-6012 (1998)
AJ004934	dapD	Tetrahydrodipicolinatsuccinylase (unvollständig)	Wehrmann, A. et al. "Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: A study with <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(12):3159-3165 (1998)
AJ007732	ppc; secG; amt; ocd; soxA	Phosphoenolpyruvatcarboxylase; ?; High affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein; mutmassliche Ornithin-cyclodecarboxylase; Sarcosinoxidase	
AJ010319	ftsY; glnB; glnD; sp; amtP	Beteiligt an Zellteilung; PII protein; uridylyltransferase (Uridylyl-entfernendes Enzym); Signalerkennungspartikel; Low affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein	Jakoby, M. et al. "Nitrogen regulation in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ; Isolation of genes involved in biochemical characterization of corresponding proteins," <i>FEMS Microbiol.</i> , 173(2):303-310 (1999)
AJ132968	cat	Chloramphenicol-acetyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AJ224946	mgo	L-malate: Chinonoxido-reductase	Molenaar, D. et al. "Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Eur. J. Biochem.</i> , 254(2):395-403 (1998)
AJ238250	ndh	NADH-dehydrogenase	Lichtinger, T. et al. "Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The channel is formed by a low molecular mass polypeptide," <i>Biochemistry</i> , 37(43):15024-15032 (1998)
AJ238703	porA	Porin	Vertes, A.A. et al. "Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 11(4):739-746 (1994)
D17429		Transposables Element IS31831	Usuda, Y. et al. "Molecular cloning of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Brevibacterium lactofermentum AJ12036) <i>odhA</i> gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase," <i>Microbiology</i> , 142:3347-3354 (1996)
D84102	odhA	2-Oxoglutaratdehydrogenase	Katsumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 1987232392-A 1 10/12/87
E01358	hdh; hk	Homoserindehydrogenase; Homoserin-kinase	Katsumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 1987232392-A 2 10/12/87
E01359		Stromaufwärts des Startcodons des Homoserinkinase-Gens	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01375		Tryptophan-Operon	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01376	trpL; trpE	Leader-Peptid; Anthranilatsynthase	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01377		Promotor- und Operator-Bereiche des Tryptophan-Operons	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment containing gene capable of coding biotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992278088-A 1 10/02/92
E03937		Biotinsynthase	Kohama, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and deshydrobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992330284-A 1 11/18/92
E04040		Diaminopelargonsäureaminotransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E04041		Desthiobiotinsynthetase	Kohana, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992330284-A 1 11/18/92
E04307		Flavum aspartase	Kurusu, Y. et al. "Gene DNA coding aspartase and utilization thereof," Patent: JP 1993030977-A 1 02/09/93
E04376		Isocitratlyase	Katsumata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93
E04377		Isocitratlyase N-terminales Fragment	Katsumata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93
E04484		Prephenatdehydratase	Sotouchi, N. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation," Patent: JP 1993076352-A 2 03/30/93
E05108		Aspartokinase	Fugono, N. et al. "Gene DNA coding Aspartokinase and its use," Patent: JP 1993184366-A 1 07/27/93
E05112		Dihydro-dipichorinatsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "Gene DNA coding dihydrodipicolinic acid synthetase and its use," Patent: JP 1993184371-A 1 07/27/93
E05776		Diaminopimelinsäuredehydrogenase	Kobayashi, M. et al. "Gene DNA coding Diaminopimelic acid dehydrogenase and its use," Patent: JP 1993284970-A 1 11/02/93
E05779		Threoninsynthase	Kohana, K. et al. "Gene DNA coding threonine synthase and its use," Patent: JP 1993284972-A 1 11/02/93
E06110		Prephenatdehydratase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93
E06111		mutierte Prephenatdehydratase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93
E06146		Acetohydroxysäuresynthetase	Inui, M. et al. "Gene capable of coding Acetohydroxy acid synthetase and its use," Patent: JP 1993344893-A 1 12/27/93
E06825		Aspartokinase	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94
E06826		mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E06827		mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94
E07701	secY		Honno, N. et al. "Gene DNA participating in integration of membrane protein to membrane," Patent: JP 1994169780-A 1 06/21/94
E08177		Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94
E08178, E08179, E08180, E08181, E08182		Durch Rückkopplungshemmung freigesetzte Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94
E08232		Acetohydroxysäureisomeroreduktase	Inui, M. et al. "Gene DNA coding acetohydroxy acid isomeroreductase," Patent: JP 1994277067-A 1 10/04/94
E08234	secE		Asai, Y. et al. "Gene DNA coding for translocation machinery of protein," Patent: JP 1994277073-A 1 10/04/94
E08643		FT-Aminotransferase und Desethiobiotin-synthetase-Promotorbereich	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95
E08646		Biotinsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95
E08649		Aspartase	Kohana, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031478-A 1 02/03/95
E08900		Dihydrodipicolinatreductase	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Dihydrodipicolinate acid reductase and utilization thereof," Patent: JP 1995075578-A 1 03/20/95
E08901		Diaminopimelinsäuredecarboxylase	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Diaminopimelic acid decarboxylase and utilization thereof," Patent: JP 1995075579-A 1 03/20/95
E12594		Serinhydroxymethyltransferase	Hatakeyama, K. et al. "Production of L-tryptophan," Patent: JP 1997028391-A 1 02/04/97
E12760, E12759, E12758		Transposase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E12764		Arginyl-tRNA synthetase; Diaminopimelin-säuredecarboxylase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12767		Dihydrodipicolinsäuresynthetase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12770		Aspartokinase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12773		Dihydrodipicolinsäurereductase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E13655		Glucose-6-phosphatedehydrogenase	Hatakeyama, K. et al. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and DNA capable of coding the same," Patent: JP 1997224661-A 1 09/02/97
L01508	IlvA	Threonindehydratase	Moeckel, B. et al. "Functional and structural analysis of the threonine dehydratase of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> 174:8065-8072 (1992)
L07603	EC 4.2.1.15	3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphatsynthase	Chen, C. et al. "The cloning and nucleotide sequence of <i>Corynebacterium glutamicum</i> 3-deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphate synthase gene," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 107:223-230 (1993)
L09232	IlvB; ilvN; ilvC	Acetohydroxysäuresynthase, große Untereinheit; Acetohydroxysäuresynthase kleine Untereinheit; Acetohydroxysäure-isomerase-reductase	Keilhauer, C. et al. "Isoleucine synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon," <i>J. Bacteriol.</i> 175(17):5595-5603 (1993)
L18874	PisM	Phosphoenolpyruvat-Zuckerphosphotransferase	Fouet, A. et al. "Bacillus subtilis sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in <i>Escherichia coli</i> and homology to enzymes II from enteric bacteria," <i>PNAS USA</i> 84(24):8773-8777 (1987); Lee, J.K. et al. "Nucleotide sequence of the gene encoding the <i>Corynebacterium glutamicum</i> mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> 119(1-2):137-145 (1994)
L27123	accB	Malatsynthase	Lee, H-S. et al. "Molecular characterization of accB, a gene encoding malate synthase in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> 4(4):256-263 (1994)

GenBank TM Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
L27126		Pyruvatkinase	Jetten, M. S. et al. "Structural and functional analysis of pyruvate kinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2501-2507 (1994)
L28760	aceA	Isocitratlyase	
L35906	dtxR	Diphtherietoxinrepressor	Oguiza, J.A. et al. "Molecular cloning, DNA sequence analysis, and characterization of the <i>Corynebacterium diphtheriae</i> dtxR from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(2):465-467 (1995)
M13774		Prephenatdehydratase	Follettie, M.T. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pheA gene," <i>J. Bacteriol.</i> , 167:695-702 (1986)
M16175	5S rRNA		Park, Y.-H. et al. "Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences," <i>J. Bacteriol.</i> , 169:1801-1806 (1987)
M16663	trpE	Anthranilatsynthase, 5'-Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M16664	trpA	Tryptophansynthase, 3'-Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M25819		Phosphoenolpyruvatcarboxylase	O'Regan, M. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the Phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032," <i>Gene</i> , 77(2):237-251 (1989)
M85106		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)
M85107, M85108		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
M89931	aecD; brnQ; yhbW	Beta C-S lyase; Verzweigtenketten-Aminosäure-Aufnahme-Carrier; hypothetisches Protein yhbW	Rossol, I. et al. "The Corynebacterium glutamicum aecD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(9):2968-2977 (1992); Tauch, A. et al. "Isoleucine uptake in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 is directed by the brnQ gene product," <i>Arch. Microbiol.</i> , 169(4):303-312 (1998)
S59299	trp	Leader-Gen (Promotor)	Herry, D.M. et al. "Cloning of the trp gene cluster from a tryptophan-hyper-producing strain of Corynebacterium glutamicum: identification of a mutation in the trp leader sequence," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 59(3):791-799 (1993)
U11545	trpD	Anthranylphosphoribosyltransferase	O'Gara, J.P. and Dunican, L.K. (1994) Complete nucleotide sequence of the Corynebacterium glutamicum ATCC 21850 trpD gene." Thesis, Microbiology Department, University College Galway, Ireland.
U13922	cgllM; cgllR; cgllIR	mutmaßliche Typ II 5-Cytosin-methyltransferase; mutmaßliche Type II Restriktionsendonuklease; mutmaßliche Typ I- oder Typ III Restriktions-endonuklease	Schafer, A. et al. "Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with Escherichia coli," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(23):7309-7319 (1994); Schafer, A. et al. "The Corynebacterium glutamicum cgllM gene encoding a 5-cytosine in an McrBC-deficient Escherichia coli strain," <i>Gene</i> , 203(2):95-101 (1997)
U14965	recA		
U31224	ppx		Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31225	proC	L-Prolin: NADP+ 5-Oxidoreduktase	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31230	obg; proB; unkth	?Gamma glutamylkinase; ähnlich den D-isomerspezifischen 2-Hydroxysäure-dehydrogenasen	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31281	bioB	Biotinsynthase	Serebriiskii, I.G., "Two new members of the bio B superfamily: Cloning, sequencing and expression of bio B genes of Methylobacillus flagellatum and Corynebacterium glutamicum," <i>Gene</i> , 175:15-22 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
U35023	thtR; accBC	Thiosulfat Schwefeltransferase; Acyl CoA-Carboxylase	Jager, W. et al. "A Corynebacterium glutamicum gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins," <i>Arch. Microbiol.</i> , 166(2):76-82 (1996)
U43535	cmr	Multidrug-Resistenzprotein	Jager, W. et al. "A Corynebacterium glutamicum gene conferring multidrug resistance in the heterologous host <i>Escherichia coli</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 179(7):2449-2451 (1997)
U43536	clpB	Hitzeschock-ATP-Bindungsprotein	
U53587	aphA-3	3'5"-Aminoglycosidphosphotransferase	
U89648		Nicht identifizierte Corynebacterium glutamicum-Sequenz, die an der Histidinbiosynthese beteiligt ist, partielle Sequenz	
X04960	trpA; trpB; trpC; trpD; trpE; trpG; trpL	Tryptophanoperon	Matsui, K. et al. "Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the Brevibacterium lactofermentum tryptophan operon," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 14(24):10113-10114 (1986)
X07563	lys A	DAP-Decarboxylase (meso-diaminopimelatdecarboxylase, EC 4.1.1.20)	Yeh, P. et al. "Nucleic sequence of the lysA gene of Corynebacterium glutamicum and possible mechanisms for modulation of its expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 212(1):112-119 (1988)
X14234	EC 4.1.1.31	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	Eikmanns, B.J. et al. "The Phosphoenolpyruvate carboxylase gene of Corynebacterium glutamicum: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 218(2):330-339 (1989); Lepoint, L. et al. "Sorghum Phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution," <i>Plant. Mol. Biol.</i> , 21 (3):487-502 (1993)
X17313	fdA	Fructose-bisphosphataldolase	Von der Osten, C.H. et al. "Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the Corynebacterium glutamicum fdA gene: structural comparison of C. glutamicum fructose-1, 6-bisphosphate aldolase to class I and class II aldolases," <i>Mol. Microbiol.</i>
X53993	dapA	L-2, 3-Dihydrodipicolinatsynthetase (EC 4.2.1.52)	Bonnassie, S. et al. "Nucleic sequence of the dapA gene from Corynebacterium glutamicum," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(21):6421 (1990)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X54223		AttB-verwandte Stelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and the attP site of lambdacorynephage," <i>FEMS. Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X54740	argS; lysA	Arginyl-tRNA-synthetase; Diaminopimelat-decarboxylase	Marcel, T. et al. "Nucleotide sequence and organization of the upstream region of the Corynebacterium glutamicum lysA gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(11):1819-1830 (1990)
X55994	trpL; trpE	mutinaßliches Leader-Peptid; Anthranilat-synthase-Komponente 1	Heery, D.M. et al. "Nucleotide sequence of the Corynebacterium glutamicum trpE gene," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(23):7138 (1990)
X56037	thrC	Threoninsynthase	Han, K.S. et al. "The molecular structure of the Corynebacterium glutamicum threonine synthase gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(10):1693-1702 (1990)
X56075	attB-verwandte Stelle	Bindungsstelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and the attP site of lambdacorynephage," <i>FEMS. Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X57226	lysC-alpha; lysC-beta; asd	Aspartokinase-alpha-Untereinheit; Aspartokinase-beta-Untereinheit; Aspartat-beta-semialdehyddehydrogenase	Kalinowski, J. et al. "Genetic and biochemical analysis of the Aspartokinase from Corynebacterium glutamicum," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(5):1197-1204 (1991); Kalinowski, J. et al. "Aspartokinase genes lysC alpha and lysC beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene asd in Corynebacterium glutamicum," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 224(3):317-324 (1990)
X59403	gap;pgk; tpi	Glyceraldehyde-3-phosphat; Phosphoglyceratkinase; Triosephosphat-isomerase	Eikmanns, B.J. "Identification, sequence analysis, and expression of a Corynebacterium glutamicum gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(19):6076-6086 (1992)
X59404	gdh	Glutamatdehydrogenase	Bormann, E.R. et al. "Molecular analysis of the Corynebacterium glutamicum gdh gene encoding glutamate dehydrogenase," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(3):317-326 (1992)
X60312	lysI	L-Lysinpermease	Seep-Feldhaus, A.H. et al. "Molecular analysis of the Corynebacterium glutamicum lysI gene involved in lysine uptake," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(12):2995-3005 (1991)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X66078	cop1	Ps1 protein	Joliff, G. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the csp1 gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The deduced N-terminal region of PS1 is similar to the <i>Mycobacterium</i> antigen 85 complex," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(16):2349-2362 (1992)
X66112	glt	Citratsynthase	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence, expression and transcriptional analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> gltA gene encoding citrate synthase," <i>Microbiol.</i> , 140:1817-1828 (1994)
X67737	dapB	Dihydrodipicolinatoreductase	Peyret, J.L. et al. "Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 9(1):97-109 (1993)
X69103	csp2	Oberflächenprotein PS2	Bonany, C. et al. "Identification of IS1206, a <i>Corynebacterium glutamicum</i> IS3-related insertion sequence and phylogenetic analysis," <i>Mol. Microbiol.</i> , 14(3):571-581 (1994)
X69104		IS3 -verwandtes Insertionselement	
X70959	leuA	Isopropylmalatsynthase	Patek, M. et al. "Leucine synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme activities, structure of leuA, and effect of leuA inactivation on lysine synthesis," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(1):133-140 (1994)
X71489	icd	Isocitratdehydrogenase (NADP+)	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence analysis, expression, and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> icd gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(3):774-782 (1995)
X72855	GDHA	Glutamatdehydrogenase (NADP+)	
X75083, X70584	mttA	5-Methyltryptophanresistenz	Heery, D.M. et al. "A sequence from a tryptophan-hyperproducing strain of <i>Corynebacterium glutamicum</i> encoding resistance to 5-methyltryptophan," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 201(3):1255-1262 (1994)
X75085	recA		Fitzpatrick, R. et al. "Construction and characterization of recA mutant strains of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 42(4):575-580 (1994)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X75504	aceA; thiX	partielle Isocitratlyase; ?	Reinscheid, D.J. et al. "Characterization of the isocitrate lyase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> and biochemical analysis of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(12):3474-3483 (1994)
X76875		ATPase beta-Untereinheit	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77034	tuf	Elongationsfaktor Tu	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77384	recA		Billman-Jacobe, H. "Nucleotide sequence of a recA gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>DNA Seq.</i> , 4(6):403-404 (1994)
X78491	aceB	Malatsynthase	Reinscheid, D.J. et al. "Malate synthase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> pia-ack operon encoding phosphotransacetylase: sequence analysis," <i>Microbiology</i> , 140:3099-3108 (1994)
X80629	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Raney, F.A. et al. "Phylogenetic analysis of the genera <i>Rhodococcus</i> and <i>Norcardia</i> and evidence for the evolutionary origin of the genus <i>Norcardia</i> from within the radiation of <i>Rhodococcus</i> species," <i>Microbiol.</i> , 141:523-528 (1995)
X81191	gluA; gluB; gluC; gluD	Glutamat-Aufnahmesystem	Kronmeyer, W. et al. "Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(5):1152-1158 (1995)
X81379	dapE	Succinyl/diaminopimelatesuccinylase	Wehrmann, A. et al. "Analysis of different DNA fragments of <i>Corynebacterium glutamicum</i> complementing dapE of <i>Escherichia coli</i> ," <i>Microbiology</i> , 40:3349-56 (1994)
X82061	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Ruimy, R. et al. "Phylogeny of the genus <i>Corynebacterium</i> deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 45(4):740-746 (1995)
X82928	asd; lysC	Aspartatsemialdehyddehydrogenase; ?	Serebrjiski, I. et al. "Multicopy suppression by asd gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous proA in proA mutants," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(24):7255-7260 (1995)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X82929	proA	Gamma-glutamylphosphatreduktase	Serebrijski, I. et al. "Multicopy suppression by asd gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous proA in proA mutants," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(24):7255-7260 (1995)
X84257	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Pascual, C. et al. "Phylogenetic analysis of the genus <i>Corynebacterium</i> based on 16S rRNA gene sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 45(4):724-728 (1995)
X85965	aroP; dapE	aromatische Aminosäurepermease; ?	Wehrmann, A. et al. "Functional analysis of sequences adjacent to dapE of <i>Corynebacterium glutamicum</i> proline reveals the presence of aroP, which encodes the aromatic amino acid transporter," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(20):5991-5993 (1995)
X86157	argB; argC; argD; argF; argJ	Acetylglutaminkinase; N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphatreduktase; Acetylornithinaminotransferase; Ornithin-carbamoyltransferase; Glutamat-N-acetyltransferase	Sakanyan, V. et al. "Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway," <i>Microbiology</i> , 142:99-108 (1996)
X89084	pta; ackA	Phosphatacetyltransferase; Acetatekinase	Reinscheid, D.J. et al. "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase," <i>Microbiology</i> , 145:503-513 (1999)
X89850	attB	Bindungsstelle	Le Marrec, C. et al. "Genetic characterization of site-specific integration functions of phi AAU2 infecting "Arthrobacter aureus C70," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(7):1996-2004 (1996)
X90356		Promotorfragment F1	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90357		Promotorfragment F2	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90358		Promotorfragment F10	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X90359		Promotorfragment F13	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90360		Promotorfragment F22	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90361		Promotorfragment F34	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90362		Promotorfragment F37	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90363		Promotorfragment F45	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90364		Promotorfragment F64	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90365		Promotorfragment F75	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90366		Promotorfragment PF101	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90367		Promotorfragment PF104	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)
X90368		Promotorfragment PF109	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> . 142:1297-1309 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X93513	amt	Ammonium-Transportsystem	Siewe, R.M. et al. "Functional and genetic characterization of the (methyl) ammonium uptake carrier of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Biol. Chem.</i> , 271(10):5398-5403 (1996)
X93514	betP	Glycin-Betain-Transportsystem	Peter, H. et al. "Isolation, characterization, and expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(17):5229-5234 (1996)
X95649	orf4		Patek, M. et al. "Identification and transcriptional analysis of the dapB-ORF2-dapA-ORF4 operon of <i>Corynebacterium glutamicum</i> , encoding two enzymes involved in L-lysine synthesis," <i>Biotechnol. Lett.</i> , 19:1113-1117 (1997)
X96471	lysE; lysG	Lysinexporterprotein; Lysinexportregulator-protein	Vrljic, M. et al. "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 22(5):815-826 (1996)
X96580	panB; panC; xylB	3-Methyl-2-oxobutanoatehydroxymethyl-transferase; Pantoat-beta-alaninligase; Xylulokinase	Sahn, H. et al. "D-pantothenate synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 65(5):1973-1979 (1999)
X96962		Insertionssequenz IS1207 und Transposase	
X99289		Elongationsfaktor P	Ramos, A. et al. "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding elongation factor P in the amino-acid producer <i>Brevibacterium lactofermentum</i> (<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869)," <i>Gene</i> , 198:217-222 (1997)
Y00140	thrB	Homoserinkinase	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine kinase (thrB) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3922 (1987)
Y00151	ddh	Meso-diaminopimelat-D-dehydrogenase (EC 1.4.1.16)	Ishino, S. et al. "Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate D-dehydrogenase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3917 (1987)
Y00476	thrA	Homoserindehydrogenase	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (thrA) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(24):10598 (1987)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Y00546	hom; thrB	Homoserindehydrogenase; Homoserin-kinase	Peoples, O.P. et al. "Nucleotide sequence and fine structural analysis of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB operon," <i>Mol. Microbiol.</i> , 2(1):63-72 (1988)
Y08964	murC; ftsQ/divD; ftsZ	UPD-N-Acetylmuramatalanilgase; Teilungsinitiationsprotein oder Zellteilungsprotein; Zellteilungsprotein	Honrubia, M.P. et al. "Identification, characterization, and chromosomal organization of the ftsZ gene from Brevibacterium lactofermentum," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 259(1):97-104 (1998)
Y09163	putP	High affinity-Prolinentransportsystem	Peter, H. et al. "Isolation of the putP gene of Corynebacterium glutamicum-proline and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes," <i>Arch. Microbiol.</i> , 168(2):143-151 (1997)
Y09548	pyc	Pyruvatcarboxylase	Peters-Wendisch, P.G. et al. "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene," <i>Microbiology</i> , 144:915-927 (1998)
Y09578	leuB	3-Isopropylmalatdehydrogenase	Patek, M. et al. "Analysis of the leuB gene from Corynebacterium glutamicum," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 50(1):42-47 (1998)
Y12472		Bindungsstelle Bacteriophage Phi-16	Moreau, S. et al. "Site-specific integration of corynephage Phi-16: The construction of an integration vector," <i>Microbiol.</i> , 145:539-548 (1999)
Y12537	proP	Prolin/Ectoin-Aufnahmesystemprotein	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(22):6005-6012 (1998)
Y13221	glnA	Glutaminsynthetase I	Jakoby, M. et al. "Isolation of Corynebacterium glutamicum glnA gene encoding glutamine synthetase I," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 154(1):81-88 (1997)
Y16642	lpd	Dihydrolipoamiddehydrogenase	
Y18059		Bindungsstelle Corynephage 304L	Moreau, S. et al. "Analysis of the integration functions of φ304L: An integrase module among corynephages," <i>Virology</i> , 255(1):150-159 (1999)
Z21501	argS; lysA	Arginyl-tRNA-Synthetase; Diaminopimelatdecarboxylase (partiell)	Oguiza, J.A. et al. "A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the lysA gene in Brevibacterium lactofermentum: Regulation of argS-lysA cluster expression by arginine," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(22):7356-7362 (1993)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Z21502	dapA; dapB	Dihydrodipicolinalsynthase; Dihydrodipicolinatreduktase	Pisabarro, A. et al. "A cluster of three genes (dapA, orf2, and dapB) of Brevibacterium lactofermentum encodes dihydrodipicolinate reductase, and a third polypeptide of unknown function," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(9):2743-2749 (1993)
Z29563	thrC	Threoninsynthase	Malumbres, M. et al. "Analysis and expression of the thrC gene of the encoded threonine synthase," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2209-2219 (1994)
Z46753	16S rDNA	Gene für 16S ribosomale RNA	
Z49822	sigA	SigA-Signalfaktor	Oguiza, J.A. et al. "Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z49823	galE; dtxR	Katalytische Aktivität UDP-Galactose 4-epimerase; Diphtherietoxin-regulatorisches Protein	Oguiza, J.A. et al. "The galE gene encoding the UDP-galactose 4-epimerase of Brevibacterium lactofermentum is coupled transcriptionally to the dmdR gene," <i>Gene</i> , 177:103-107 (1996)
Z49824	orf1; sigB	?; SigB-Signalfaktor	Oguiza, J.A. et al. "Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z66534		Transposase	Correia, A. et al. "Cloning and characterization of an IS-like element present in the genome of Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869," <i>Gene</i> , 170(1):91-94 (1996)

- 1) Eine Sequenz für dieses Gen wurde in den angegebenen Literaturstellen veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung erhaltene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht und somit nur ein Fragment des tatsächlichen codierenden Bereichs darstellt.

TABELLE 3: Corynebacterium- und Brevibacterium-Stämme, die sich in der erfindungsgemäßen Praxis einsetzen lassen.

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniaenes	21054							
Brevibacterium	ammoniaenes	19350							
Brevibacterium	ammoniaenes	19351							
Brevibacterium	ammoniaenes	19352							
Brevibacterium	ammoniaenes	19353							
Brevibacterium	ammoniaenes	19354							
Brevibacterium	ammoniaenes	19355							
Brevibacterium	ammoniaenes	19356							
Brevibacterium	ammoniaenes	21055							
Brevibacterium	ammoniaenes	21077							
Brevibacterium	ammoniaenes	21553							
Brevibacterium	ammoniaenes	21580							
Brevibacterium	ammoniaenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	aminoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	aminoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							
Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

Siehe Sugawara, H. et al. (1993) World directory of collections of cultures of microorganisms:

Bacteria, fungi and yeasts (4. Aufl.), World federation for culture collections world data center on microorganisms, Saimata, Japan.

RXN02280 translatiert von RXN02280 (171) von 1 bis 1824

MQESSRDNFQVDLGGVVDLLSRHIYSGPRVYVRELLQNAVDACTARSEQGEEGYEPSIRIRPVTKDRATFSLVDNGTGLTAQE
ARELLATVGRTSKRDEFGLQREGRLGQFGIGLLSCFMVADEITMVSHAEGASAIRWTGHADGTFNLEILGDDATDVIPVGTTV
HLTPRPDERTLLTENSVVTIASNYGRYLPPIPIVQGEKNTTITTSFVFAKDQDQHRLYAGRERLGKTPFDVIDLTGPGIEGV
AYVLPEAQAPHMSRRHSIYVNRMLVSDGPSTVLPNWAFVFECEINSTDLEPTASREALMDDTAFAATREHIGECIKSWLINLA
MTKPHRVREFTAIHDLALRELCQSDADLAETMLGLLTLETSRGRISIGEITTLSTEDVSLQLATTLLDDFRQLNTIARPDTLI
INGGYIHDSDLARLIPVHYPLTVSTADLRESMDLMELPPLQDIEKAKALDAQVTESLKDFQIKGATRVFEPADVPAVVIIDS
KAQASDRNETQSATTDWRADILATVDNTLSRQTANIPQDQGLSALCLNWNNSLVRKLASTDDTAVVSRTVRLLYVQALLSSK
RPLRVKERALLNDSLADLVSLSLSSDI

RXN02280 - 5'-Region

CGCGATTGCGTCATCGATCGTTGTTGCTTCCATGCGCACCACACTATCTTTCTGCACGCCCTGATGCCCTGTGGATTCAAAAC
TGTGCTTTTATAGGCGT

RXN02280 - kodierende Region

ATGCAAGAATCCTCACGTGATAATTTCCAAGTTGACCTCGGCGGCGTGTGTTGATCTTTTGAGTCGCCACATTTATTCGGGTCC
GAGGGTGTATGTGCGTGAGTTGCTGCAGAATGCGGTTGATGCTTGACTGCACGTTCTGAACAGGGTGAGGAGGGCTACGAGC
CGAGTATTCGTATTCGGCCGGTGACCAAGGATCGTGCCACGTTTTCCTGCTGTTGATAATGGTACGGGCCTGACCGCGCAGGAG
GCGCGGAATTGCTGGCGACGGTGGGGCGGACGTCGAAACGCGATGAATTCGGTCTGCAGCGGGAAGGTCGCTGGGGCAATT
TGGCATCGGGCTGCTTAGTTGTTTCATGGTGGCGGATGAGATCACCATGGTGTGCGATGCGGAGGGTGCGTCGGCGATTCCGGT
GACTGGTCATGCGGATGGCACCCTTAACCTGGAGATTCTTGGGGATGACGCAACGGATGTCATTCCGGTGGGCACGACTGTG
GCTGACTCCGCGCCCTGATGAGCGCACGTTGCTGACGGAAAATTCCGTTGGTCACCATTTGCTAGTAATTATGGCCGCTACCT
GCTGATTCTTATTGTGGTGAGGGTGAGAAAAACACCACCATCACTACATCGCCGGTGTGTTGCAAAGGATACTGATCAGCAGC
ACAGGCTGTATGCCGGCCGGGAGCGCCTTGGTAAACTCCTTTTGATGTGTCATCGATCTCACCAGGTCCTGGCATCGAGGGTGTG
GCTTATGTATTGCCGGAGGCCAGGCTCCGCATATGTCCAGGCGTCACAGTATTTATGTCAACCGCATGTTGGTCTCTGATGG
GCCTTCCACGGTGCTGCCCAACTGGGCGTTCTTTGTGGAATGTGAAATCAATTCAACCGATTTGGAACCCACCGCATCGCGTG
AAGCGCTCATGGATGACACCGCGTTCGCGGCAACCAGGGAACATATCGGTGAGTGCATTAAATCGTGGCTGATTAATCTCGCC
ATGACCAAGCCTCACCAGCGTGCAGGGAATTTACTGCGATTGATGATCTTGCCCTGCGCGAGCTGTGCCAATCGGACGCGGACCT
GGCTGAAACCATGTTGGGTCTTCTCACCTTGGAGACCTCCCGTGGTTCGATCTCGATCGGTGAGATCACCACGTTGTCCATCA
CCGAGGATGTGTCGCTGCAGCTGGCTACCACGTTGGATGATTTGAGGACGCTCAACACCATTTGCGCGCCCGGACACCTTGATT
ATTAATGGCGGCTACATTCACGACAGCGATCTGGCTCGGCTCATTCCCCTTCACTACCCACCGCTTACGGTATCTACTGCTGA
CCTGCGGAATCCATGGATCTGATGGAGCTTCCGCGCTGCAGGACATTGAGAAAGCCAAGGCACTGGATGCGCAGGTCACGG
AATCATTGAAGGATTTTCAGATCAAGGGCGCAACGAGGGTTTTTGAACCCGAGATGTTCCGCGTGGTGATCATTGATTCC
AAGGCGCAGGCCTCACGGGATCGCAATGAAACACAAAGCGCAACCACCTGATCGTTGGGCTGACATTTTGGCAACGGTGGATAA
CACGTTGAGCCGTCAAACAGCCAACATTCCACAGGATCAGGGACTGTGCGCGTGTGCTTGAATTGGAACAATTGCTGGTCA
GGAAATTGGCGTCCACTGATGACACCGCGTGGTGTGCGCACGGTGCCTTTGCTCTACGTTGAGGATTTGTTGTCCAGCAAG
AGGCCACTGCGGGTGAAGGAACGCGCGCTGCTTAATGATTCGCTGGCAGATCTGGTTTCTTTGTCTTTGTGTCATCCGATATC

RXN02280 - 3'-Region

TAAGACAATCCTCCGCTAATCTT

RXN02736 translatiert von RXN02736 (2617) von 1 bis 957

MIFELPDTTTQQISKTLTRLRESGTQVTTGRVLTLLIVVTDSESDVAAVTESTNEASREHPSRVIIILVVGDKTAENKVDAEVRI
GGDAGASEMIIMHLNGPVADKLQYVVTPLLLPDTPIVAWWPGESPKNPSQDPIGRIAQRRTDALYDRDDALEDRVENYHPGD
TDMTWARLTQWRGLVASSLDHPPHSEITSVRLTGASGSTSVDLAAGWLARRLKVPVIREVTDAPTVPPTDEFGTPLLAIQRLEI
VRTTGSIIITIYDAHTLQVEMPESGNAPSLVAIGRRSESDCLSEELRHMDPDLGYQHALLSGLSSVKLETV

RXN02736 - 5'-Region

CAGAGGATTACCCAGCGGGTACGTGGGGTCCAAAGAGCGCTGATGAAATGCTTTCCCGCAACGGTCACACCTGGCGCAGGCCA
TAATTTAGGGGCAAAAA

RXN02736 - kodierende Region

ATGATCTTTGAACTTCCGGATACCACCACCCAGCAAATTTCCAAGACCCTAACTCGACTGCGTGAATCGGGCACCCAGGTCAC
CACCGGCCGAGTGCTCACCTCATCGTGGTCACTGACTCCGAAAGCGATGTCGCTGCAGTTACCGAGTCCACCAATGAAGCCT
CGCGCGAGCACCCATCTCGCGTGATCATTGTTGGTGGTGGCGATAAACTGCAGAAAACAAAGTTGACGCAGAAGTCCGTATC
GGTGGCGACGCTGGTGCTTCCGAGATGATCATCATGCATCTCAACGGACCTGTCGCTGACAAGCTCCAGTATGTCGTACACC
ACTGTTGCTTCCTGACACCCCCATCGTTGCTTGGTGGCCAGGTGAATCACCAAAGAATCCTTCCCAGGACCCAATTGGACGCA
TCGCACAACGACGCATCACTGATGCTTTGTACGACCGTGATGACGCACTAGAAGATCGTGTGAGAACTATCACCCAGGTGAT
ACCGACATGACGTGGGCGCGCCTTACCCAGTGGCGGGGACTTGTTCCTCCTCATTGGATCACCCACCACACAGCGAAATCAC
TTCCGTGAGGCTGACCGGTGCAAGCGGCAGTACCTCGGTGGATTTGGCTGCAGGCTGGTTGGCGCGGAGGCTGAAAGTGCCTG
TGATCCGCGAGGTGACAGATGCTCCACCGTGCCAACCGATGAGTTTGGTACTCCACTGCTGGCTATCCAGCGCCTGGAGATC
TTTCGCACCAACCGGCTCGATCATCATCACCATCTATGACGCTCATACCTTCAGGTAGAGATGCCGGAATCCGGCAATGCCCC
TCGCTGGTGGCTATTGGTTCGTCGAAGTGAGTCCGACTGCTTGTCTGAGGAGCTTCGCCACATGGATCCAGATTTGGGCTACC
AGCACGCACTATCCGGCTTGTCAGCGTCAAGCTGGAAACCGTC

RXN02736 - 3'-Region

TAAGGAGAAATACAACACTATGG

RXN02002 translatiert von RXN02002 (9539) von 1 bis 378

MSNANSDDTTAAEAHRRRTFAVIAHPDAGKSTLTEALALHAHIISEAGATHGKAGRKATVSDWMEKDRGISIASSALQFEYA
PEGHAGEPFMINLVDTPGHADFSEDTYRVLMAVDAAVMLMHSV

RXN02002 - 5'-Region

AAGTGGCAAAAAACGTTTCAAGCAGGCAACGCCGGCGTACAACTTCGCTGAGCTGGGGCGATTATGGCCCAGCGCCCAACCC
CGCTATTCTTAATACCC

RXN02002 - kodierende Region

ATGAGCAACGCCAATTCCGACACCACCGCCGCCGAGGCACATCGCCGCAGAACATTGCGCGTAATCGCACACCCCGACGCCGG
TAAATCCACCCCTACCGAGGCATTGGCGCTGCATGCACACATCATCTCCGAAGCCGGCGCCACCCACGGCAAAGCAGGCCGCA
AAGCCACCGTTTCCGACTGGATGGAAATGGAAAAAGACCGCGGCATCTCCATCGCCTCCTCCGCACTCCAATTCGAGTACGCA
CCAGAAGGCCACGCAGGCGAGCCCTTCATGATCAACCTCGTGGACACCCAGGCCACGCCGACTTCTCCGAAGACACCTACCG
CGTCCTCATGGCCGTCGACGCAGCAGTCATGCTTATGCACTCCGTC



RXN01926 translatiert von RXN01926 (2379) von 1 bis 741

LRSFYTPEQAIEREQDVWKAATEEAELLAADGAVHDQELFLNCTTSPLIFASAMLNFGVHQILD TLCQLAPSPAGRDADP
KALEAATSAMDDHRDTTDDFSGVVFKVQAGMDKNHRDTLAFMRVVSGEFDRGMQVTHSQSGRSFSTKYALTVFGRTRSTV
ETAFFPGDIVGLVNAGALAPGDTIFEGRKIQYPPMPKFAPEHFRI LRAKSLGKYKQFRKALEQLDSEG VVQILKNDLRGDA
NPGHGRC

RXN01926 - kodierende Region

CTGCGAAGCTTCTACACCCCAGAACAAGCCATCGAACGCGAAGGCGACGTCTGGAAAGCCGCCACCGAAGAAGCAGAACT
CCTCGCAGCTGACGGCGCCGTCCACGACCAGGAACCTCTTCCTCAACTGCACCACCTCCCCACTGATCTTCGCCTCCGCGA
TGCTCAACTTCGGCGTCCACCAAATCCTGGACACCTCTGCCAACTCGCACCATCCCCCGCCGGCCGCGACGCAGACCCC
AAAGCCCTCGAAGCCGCCACCTCCGCAATGGACGACCACCGCGACACCACCGACGACTTCTCCGGCGTCTGTCTTCAAAGT
CCAAGCCGGCATGGACAAAAACCACCGCGATACCTTCGCCTTCATGCGCGTCTGTCTCCGGCGAATTCGACCGCGGCATGC
AAGTCACCCACTCCCAATCCGGCCGCGAGCTTCTCCACCAAATACGCCCTCACCCTCTTCGGCCGCACCCGCTCTACCGTC
GAAACCGCCTTCCCCGGCGACATCGTCGGCCTCGTCAACGCCGGCGCCCTCGCACCAGGCGACACCATCTTCGAAGGCCG
AAAAATCCAATACCCACCAATGCCAAAATTCGCGCCAGAACACTTCCGCATCCTGCGCGCCAAATCACTCGGCAAATACA
AACAGTTCCGCAAAGCCCTCGAGCAGCTGGACTCCGAAGGTGTCGTCCAGATCCTCAAGAACGACCTGCGTGGCGACGCC
AACCAGGTCATGGCCGGTGT

RXN01837 translatiert von RXN01837 (8888) von 1 bis 777

VSTNKERRQQALSQLEKEIKSRDRKEKTKPLTVVFASLAVILVVVGGIWIYAATRSTEDDEVITADETSTTAETPDYQPLALTRT
TALGDSVTCEYPDAGEASKDVSKPATENVPATGTVTVNLTQAQGNIGMELDRSVSPCTVNAVEHMASEGYYNDTVCHRITTS
IYVLQCGDPSSTGAGGPGFSFANEYPTDEATDLTTPVIYERGTIAMANAGADTNGLPVLPQLRGFPTGTELHLLRPDHRRRPC
NPRRHRRSWH

RXN01837 - 5'-Region

CCCCATCATTCCTCAAGGTGTGAAGATACGGTTAGGATAGAAAAGAATTTTTTTTGACGTTGGACATTCTCAAAATCAAGTA
GCAAGGGATCAAACCTCT

RXN01837GTGAGTACTAATAAGGAACGACGCCAACAGGCGCTTTCCCAGCTGGAGAAAGAAATCAAAGCCGGGACCGCAAA
GAAAAGACCAAGCCACTAACCGTGGTCTTTGCTTCCCTGGCTGTCATCCTGGTTGTCGTTGGCGGTATCTGGTACGCAGCTAC
CCGCAGCACCAGAACGACGAAGTCATCACCGCTGATGAAACATCCACCACCGCAGAGACCCCTGACTACCAGCCACTGGCGCTGA
CCCGCACCACCGCGCTCGGCGACTCCGTGACCTGTGAGTACCCAGATGCTGGCGAGGCTTCCAAGGATGTCTCCAAGCCTGCT
ACTGAAAACGTGCCAGCAACCGGCACCGTGACCGTCAACCTGACCACCGCCCAGGGCAACATCGGCATGGAACCTTGATCGCTC
CGTATCCCCCTTGACCGTCAACGCTGTTGAGCACATGGCTTCCGAGGGCTACTACAACGATACTGTCTGCCACCGCATCACCA
CCTCTGGCATTACGTTCTCCAGTGCGGCGATCCAAGCAGCACCGGCGCAGGCGGCCAGGGTTCAGCTTCGCCAACGAATAC
CCAACCGACGAAGCAACTGACCTAACCACCCAGTCATCTACGAGCGCGGCACCATCGCCATGGCCAACGCTGGCGCTGACAC
CAACGGGCTCCAGTTCTTCTCAACTACGAGGATTCCCCACTGGCACCGAACTACACCTACTTCGGCCAGATCACCGAAGAA
GGCCTTGCAACCCTCGACGCCATCGCAGAAGTTGGCAC

RXA01837 - 3'-Region

TGAAGGTGGAACCGGCGACGGAG

RXN01345 translatiert von RXN01345 (9398) von 1 bis 1452

MRFGDLGTTTRTIAAAVDRGNYPVITVEDSLGDTHDFIPSVVALKADRIVAGWDAIEVGQDHPFSFVRSFKRLLSEPNVTEATP
VYLGDVHPLGAVLEAFAENVVTALRAFQTLGDTSPIEVVIGVPANSHSAQRLLTMSAFSATGITVVGLVNEPSAAAFHEYTH
RHARTLNSKRQAIVVYDLGGGTFDSSLIRIDGTHHEVVSSIGISRLGGDDFDEILLQCALKAAGRQHDFAFGKRAKNTLLDESR
NAKEALVPQSRRLVLEIGDDITVPVNKFYEAATPLVEKSLSIMPLIGVDDLKSDIAGIYLVGGGSSLPLVSRLLRERFGR
RVHRSPFPSTAVGLAIAADPSSGFHLRDRVARGIGVFREHDSGRAVSFDPLIAPDTSATVAKRCYKAVHNIGWFRFVEYS
TVSEDGSPGDISLLSEIKIPFDSSITDVDATEISRFDGPEVEETITVNDNGVASISIKILGGVTVEHTI

RXN01345 - 5'-Region

CATAACCTCATTGAACATGCAAACTAATGCTTTTGGGGGGTATGCATAAATTCGTTTTCGTTCCACTGCACAGCCCCGAAAATG
CTGCTAGGGTCAAGTTC

RXN01345 - kodierende Region

ATGCGTTTGGACTTGACTTGGGAACACCCGCACAATCGCGGGCCGCGTGGACCGCGGAACTATCCCATCGTCACTGTGGA
AGATTCCTTAGGCGACACCCACGATTTTATTCCATCTGTGGTGGCCCTCAAGGCAGATAGGATTGTGCGGGGTGGGATGCTA
TTGAGGTGGGCAGGACCACCTTCCTTCGTACGTTCTTTCAAACGCCTACTCTCTGAACCCAATGTCACGGAAGCCACCCCG
GTCTACTTGGGCGATCATGTACACCCTTTGGGCGCCGTCCTGGAGGCTTTTGGGAAAACGTGGTCACTGCGCTGCGTGCATT
TCAGACGCAATTGGGAGATACCTCCCGATCGAAGTAGTCATTGGTGTGCCCCGCAACTCCACAGCGCCCGAGCGACTGCTCA
CCATGTCCGCCTTCAGCGCCACAGGCATCACCGTTGTGCGTTTGGTCAATGAGCCAGCGCCGAGCTTTCGAGTACACCCAC
CGCCACGCCCCGACCTTAAACTCCAAGCGCCAAGCCATCGTGGTTTATGATTTGGGAGGCGGAACATTGACTCCTCGCTCAT
CCGCATCGACGGCACCCACGAGGTTGTGTCTCCATTGGCATTTCACGCCTTGGTGGCGATGATTTTCGATGAAATCCTCC
TCCAATGCGCGCTCAAGGCCGAGGCAGACAGCAGATGCGTTTGGCAAGCGTGCTAAAAACACGCTTCTCGACGAATCCCGC
AACGCGAAGGAAGCTCTTGTTCGCAATCCCGTCGCTTGGTTCTAGAAATTGGCGACGACGACATCACCGTTCCAGTGAACAA
GTTCTACGAGGCTGCCACTCCCCTGGTGGAAAAATCCTTGTCCATCATGGAACCCCTCATCGGCGTCGATGATCTTAAAGATT
CCGACATCGCAGGCATCTACCTTGTGGTGGAGGATCCTCGCTCCCACTCGTTTCCAGGTTGCTCCGCGAGCGTTTCGGCCGC
CGTGTCCACCGCTCCCATTTCCCTCAGGTTCCACTGCGGTGGGTCTGGCCATCGCGGCTGACCTTCTCTGGTTTCCACCT
AAGGGACCGGTTGCGCGAGGCATCGGTGTGTTCCGTGAGCACGATTCTGGTCTGCGGTGAGCTTTGACCCGCTGATCGCCC
CGGACACCGATTCTGCGACCGTGGCGAAACGATGCTACAAGCGGTGCACAACATTGGTTGGTTCAGGTTTCGTGGAATACTCC
ACCGTGTCCGAGGATGGCAGCCCCGAGATATTTCCCTGCTCAGTGAAATCAAGATTCCCTTTTGATAGCTCCATCACCGATGT
GGATGCTACCGAGATTTACGTTTCGATGGCCAGAAAGTAGAAGAAACCATCACAGTCAATGACAACGGCGTGGCTTCCATTT
CCATCAAGATACTCGGCGGCGTTACCGTCGAGCACACAATT

RXN01345 - 3'-Region

TAGTTACCATTTTGGTGGTGGTG

RXN02543 translatiert von RXN02543 (6877) von 1 bis 1854

MGRAVGIDLGTTNSVSVLEGGEPPVIANAEGRSTTPSVVAFKNGEVLVGQSAKNQAVTNVDRTIRSVKRHIGTDWSVAIDD
KNYTSQEISARTLMKLRDAEAYLGEDVTDVITVPAYFEDSQRQATKEAGQIAGLNVLRIVNEPTAAALAYGLEKGEQEQT
LVFDLGGGTFDVSLLLEIGDGVVEVRATSGDNELGGDDWDQRIVDWLVEKFQSSNGIDLTKDKMALQRLREAAEKAKIELSSSQ
SANINLPYITVDADKNPLFLDETLRAEFQRITQDLLARTKTPFNQVVKDAGVSVSEIDHVVVLVGGSTRMPAVTELVKELTGG
REPNGKGNPDEVVAVGAALQAGVLRGEVKDVLVLLDVTPLSLGIETKGGVMTKLIERNTTIPTKRSETFTTAEDNQPSVQIQVF
QGEREIATANKLLGSFELGGIAPAPRGVPQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTITIQDGSGLSQDEIDRMIKDAEAHAD
EDKKRREEQEVNRNNAESLVYQTRKFVEENSEKVSIEDLKAKVEEAAKGVVEALKGEDLEAIKAAVEKLNTESQEMGKAIYEADA
AAGATQADAGAEGAADDNVVDAEVVEDDAADNGEDKK

RXN02543 - 5'-Region

CTCAATGAGGAGTTTTTCTTACCGGCGAAAGTCGGTGGAAGCAAGTCAAAGCTCAAGCCGTGGACAGTACTAAAATCACCTA
AAACAGGAGGCACCAT

RXN02543 - kodierende Region

ATGGGACGTGCAGTAGGAATTGACCTTGAACCACTCTGTGTTTCCGTACTTGAAGGCGGCGAGCCAGTAGTTATCGC
AAACGCAGAAGGCTCACGCACCACCCCTTCCGTGCTTGCATTCGCAAAGAACGGTGAAGTTCTAGTCGGCCAGTCCGCTAAGA
ACCAGGCGGTACCAACGTTGACCGCACCATTCGCTCCGTCAAGCGCCACATCGGCACCGACTGGTCCGTGCTATCGATGAC
AAGAACTACACCTCACAGGAAATCTCGGCTCGTACCCTGATGAAGCTGAAGCGCGACGCTGAAGCATACCTGGGCGAGGACGT
CACTGATGCTGTTATTACCGTTCCTGCATACTTCGAGGACTCACAGCGCCAGGCAACCAAGGAAGCTGGTCAGATCGCAGGCC
TTAACGTTCTGCGTATTGTTAACGAGCCAACCGCGGCTGCACTTGCATACGGCCTTGAGAAGGGCGAGCAGGAGCAGACCATT
CTGGTATTTCGACCTCGGTGGCGGCACCTTCGACGTCTCCCTCCTAGAGATCGGCGACGGTGTGTTGAGGTTTCGCGCAACCTC
CGGCGATAACGAGCTCGGTGGCGACGACTGGGATCAGCGTATCGTTGACTGGCTGGTAGAGAAGTTCCAGTCTCCAACGGCA
TTGACCTGACCAAGGACAAGATGGCCCTGCAGCGTCTGCGTGAGGCAGCTGAGAAGGCAAAGATCGAGCTGTCTCTTCCAG
AGTGCAAACATCAACCTTCCCTTACATCACCGTTGATGCAGACAAGAACCCTGTTCTTGATGAGACCCCTTCCCGTGCCGA
GTTCCAGCGCATCACCCAGGACCTCCTGGCCCGCACCAAGACTCCTTTCAACCAGGTTGTTAAGGACGCTGGCGTGTCCGTCT
CGGAGATCGACCACGTTGTTCTCGTCGGTGGTTCCACCCGTATGCCTGCTGTTACCGAACTGGTCAAGGAACTGACCGGTGGA
CGTGAGCCAAACAAGGGTGTTAACCCAGATGAGGTTGTTGCAGTTGGTGCAGCACTTCAGGCCGGTGTCTCCGCGGCGAGGT
CAAGGATGTTCTTCTTCTTGACGTCACCCCACTGTCCCTCGGCATTGAGACCAAGGGTGGCGTGATGACCAAGCTCATCGAGC
GCAACACCACCATCCCTACCAAGCGTTCCGAGACCTTACCACCGCAGAGGACAACCAGCCTTCTGTTTCAGATCCAGGTCTTC
CAGGGCGAGCGTGAAATCGCAACCGCCAACAAGCTGCTCGGATCCTTCGAGCTCGGCGGCATCGCACCTGCACCACGTGGCGT
CCCACAGATCGAGGTCACTTTCGACATCGACGCCAACGGCATCGTCCACGTCACCGCAAAGGACAAGGGTACTGGCAAGGAAA
ACACCATACCATTCAGGACGGCTCCGGTCTCTCCAGGATGAAATGATCGCATGATCAAGGATGCTGAAGCTCACGCTGAT
GAGGACAAGAAGCGCCGCGAGGAGCAGGAAGTCCGCAACAACGCTGAGTCCCTGGTTTACCAGACCCGCAAGTTCTGTTGAAGA
GAACTCCGAGAAGGTCTCCGAAGACCTCAAGGCAAAGGTGCAAGAGGCAGCCAAGGGCGTTGAAGAAGCACTCAAGGGCGAGG
ACCTCGAGGCAATCAAGGCTGCAGTTGAGAAGCTGAACACCGAGTCCCAGGAAATGGGTAAGGCTATCTACGAGGCTGACGCT
GCTGCTGGTGCAACCCAGGCTGACGCAGGTGCAGAAGGCGCTGCAGATGACAATGTTGTTGACGCTGAAGTTGTGCAAGACGA
CGCAGCTGACAATGGTGAGGACAAGAAG

RXN02543 - 3'-Region

TAAATGACTACCCCTAACGGAAT

RXN00493 translatiert von RXN00493 (4601) von 1 bis 1614

MAKLIAFDQDAREGILRGVDALANAVKVTLGPRGRNVVLDKAFGGPLVTNDGVTIARDIDLEDPPFENLGAQLVKSVAVKTNDI
AGDGTATLLAQALIAEGLRNVAAGANPMELNKGISAAAEKTLEELKARATEVSDTKEIANVATVSSRDEVVGEIVAAAMEK
VGKDGVTVEESQSIETALEVTEGISFDKGYLSPYFINDNDTQQAVLDNPAVLLVRNKISSLPDFLPLEKVVESNRPLIIA
EDVEGEPLQTLVVNSIRKTIKVVAVKSPYFGDRRKAFMDDLAIVTKATVVDPEVGINLNEAGEEVFGTARRITVSKDETIIVD
GAGSAEDVEARRGQIRREIANTDSTWDREKAEERLAKLSGGIAVIRVGAATETEVNDRKLRVEDAINAARAAAQEGVIAGGGS
ALVQIAETLKYAEFEFGDQKVGVRALATALGKPAYWIASNAGLDGSVVVARTAAALPNGEFGFNAATLEYGNLINDGVIDPVKV
THSAVVNATSVARMVLTTEASVVEKPAEEAADAHAGHHH

RXN00493 - 5'-Region

CCC GTTACGGCGGCACCGAGATCAAGTTCGGTGGCGTGGAGTACTTGCTTCTCTCCGCTCGTGACATCCTCGCAATCGTCGAG
AAGTAGGGGATAAGTTC

RXN00493 - kodierende Region

ATGGCAAAGCTCATTGCTTTTGACCAGGACGCCCGCGAAGGCATTCTCCGGGGCGTTGACGCTCTGGCAAACGCTGTCAAGGT
AACCCTCGGCCCACGCGGCCGTAACGTGGTTCTTGATAAGGCATTTCGGCGGACCTCTGGTCACCAACGACGGTGTCAACATG
CCCGCGACATCGACCTTGAGGATCCTTTTGAGAACCTCGGTGCGCAGCTGGTGAAGTCCGTTGCTGTTAAGACCAACGACATC
GCTGGTGACGGCACCACGACTGCAACTCTGCTTGCTCAGGCACTCATTGCTGAAGGCCTGCGCAACGTTGCTGCTGGCGCAA
CCCAATGGAGCTCAACAAGGGTATTTCTGCAGCTGCAGAAAAGACCTTGGAAGAGTTGAAGGCACGCGCAACCGAGGTGTCTG
ACACCAAGGAAATCGCAAACGTCGCTACCGTTTCATCCCGCGATGAAGTTGTCGGCGAGATCGTTGCTGCAGCGATGGAAAAG
GTTGGCAAGGACGGTGTCTGTCACCGTTGAGGAGTCCCATCGAGACTGCTCTCGAGGTCACCGAAGGTATTTCTTTTCGA
AAGGGCTACCTTTCCCTTATTTTCATCAACGACAACGACACTCAGCAGGCTGTCTGGACAACCCTGCAGTGCTGCTTGTTC
GCAACAAGATTTCTTCCCTCCAGACTTCCTCCCATTGCTGGAGAAGGTTGTGGAGTCCAACCGTCCTTTGCTGATCATCGCA
GAAGACGTCGAGGGCGAGCCTTTGCAGACCCTGGTTGTGAAGTCCATCCGCAAGACCATCAAGGTCGTTGCAGTGAAGTCCCC
TTACTTCGGTGACCGACGCAAGGCGTTCATGGATGACCTGGCTATTGTCAACCAAGGCAACTGTCGTGGATCCAGAAGTGGGCA
TCAACCTCAACGAAGCTGGCGAAGAAGTTTTCGGTACCGCACGCCGCATCACCGTTTCCAAGGACGAAACCATCATCGTTGAT
GGTGCAGGTTCCGCAGAAGACGTTGAAGCACGTCGCGGCCAGATCCGTCGCGAAATCGCCAACACCGATTCCACCTGGGATCG
CGAAAAGGCAGAAGAGCGTTTGCTAAGCTCTCCGGTGGTATTGCTGTCATCCGCGTTGGTGCAGCAACTGAAACCGAAGTCA
ACGACCGCAAGCTGCGTGTCGAAGATGCCATCAACGCTGCTCGCGCAGCAGCACAAGAAGGCGTTATCGCTGGTGGCGGTTCC
GCTTTGGTTTCAGATCGCTGAGACTCTGAAGGCTTACGCCGAAGAGTTTGAAGGCGACCAAGGTCGCGGCTTCGCGCACTGGC
TACTGCTTTGGGCAAGCCAGCGTACTGGATCGCTCCAACGCAGGCTTTGACGGCTCTGTTGTTGTTGCACGCACTGCTGCTC
TGCCAAACGGCGAGGGCTTCAACGCTGCAACTTTGGAATACGGAAACCTGATCAACGACGGTGTATCGACCCAGTCAAGGTC
ACCCATTCCGCAGTAGTGAATGCAACCTCTGTTGCACGCATGGTTCTGACCACTGAGGCTTCTGTTGTTGAGAAGCCTGCAGA
AGAAGCAGCCGATGCACATGCAGGACATCATCACAC

RXN00493 - 3'-Region

TAAAGTTCTGTGAAAAACACCGT

RXN02325 translatiert von RXN02325 (7224) von 1 bis 867

MDHAHDSCSPTLRRDLEVTGQLQPEKAVDLAAPHEGKVANITKVTSSNMEHTITQASKAKEVVVLIGHSLLP TFQDLEKDILH
FQAGNKGRFSVAIVDPDRSADVVARFRPKQIPVAYVVKDGASIAEFNSLNKEPVAQWLDHFVSRETIPNEKEGDVDKQIDPRL
WRAAELVNAGDFRAALALYEQLPQDATVKRAHAAVSVLARMSVADRGEDPIEKSRDPDDVNKALAAADMYVLMNQPD TALAH
LAALLPKPEAARRIVELLNLFDPDLVLEIRAQVGNAMS

RXN02325 - 5'-Region

CAGAGATTTGAAGATGGAGACCAAGGCTCAAAGGGAATCCATGCCGTCTTGGTTTAATACTGCACCCGTCTAATGAAAATCAT
TACTATTAGGTGTCATG

RXN02325ATGGACCATGCACACGATTCTCTGCTACCAACTCTGCGCCGTGATTTGGAGGTCACTGGCCAGCTCCAACCTGAG
AAAGCTGTTCGATTTAGCAGCGCCGCACGAAGGGAAGGTTGCCAATATAACGAAGGTGACCTCCTCAAATATGGAGCACACCAT
CACGCAGGCCTCAAAAAGCTAAGGAGGTGGTGGTGCTCATTGGTCACTCCCTGCTGCCACATTTTCAGGATTTGGAAAAAGACA
TTCTGCACTTTTCAGGCAGGTAATAAAGGGCGATTTTCTGTAGCGATTGTTGATCCTGATCGCAGTGCAGATGTGGTTGCCAGA
TTTAGGCCAAAAACAGATTCCGGTGGCATACTGTTGAAAGATGGCGCCAGCATTGCCGAGTTCAACTCGCTCAACAAGGAGCC
GGTTGCACAATGGCTTGATCATTTTGTGTCTCGGGGAAACGATCCCAATGAAAAAGAGGGGGACGTCGATAAGCAAATAGACC
CGGCCTGTGGCGGGCAGCGGAATTGGTGAACGCCGCTGATTTTCGCGCGGCGTTGGCGTTGTATGAGCAGTTGCCGCAGGAT
GCGACGGTGAAGCGGGCGCACGCGGCGGTGTCTGTTGCGCGGATGTCTGTGGCGGATCGGGGAGAGGATCCGATCGAGAA
GTCGCGCCGGGATCCAGACGATGTGAACAAGGCGCTGGCGGCGGCGGATATGTATGTGTTGATGAATCAGCCGGACACAGCGC
TCGCGCACCTTGCAGCACTATTGCCAAAACCGGAGGCTGCCCGGCGGATCGTGGAGTTGCTGAACTTGTTTGATCCGCTGGAC
CTGGTCGCATTGGAAATCAGGGCGCAGGTGGGGAATGCAATGAGC

RXA02325 - 3'-Region

TAAGAAAACACTTTAAATATTCT

RXN00937 translatiert von RXN00937 (2481) von 1 bis 372

MATIDVTEETFESTVTGDGIVLVDASWCGPCRQFAPTYEKVSEHTDATFAKLDTEANQGLAAALQIQSIPTLMVFRDGIM
VYREAGTMPAPALDDLNVQKALDMDVRRQVAEQGSAEA

RXN00937 - 5'-Region

AGCTGCCGGTCAATGAAGAAAATCCTTGGCCGGGAATAACTACAGTCCGCTGAAAGTTGGTCTATATATAGACCTTACAAATC
TTGAACGGAGATTCTTA

RXN00937 - kodierende Region

ATGGCAACCATCGATGTAACCGAAGAAACATTTGAGAGCACAGTTACCGGCGACGGAATTGTCCTCGTAGACGCATGGGCATC
CTGGTGCGGACCTTGCCGCCAGTTCGCCCCAACCTACGAGAAGGTTTCCGAAACCCACACCGACGCAACCTTCGCCAAGCTTG
ATACCGAAGCAAACCAGGGCCTGGCTGCAGCACTGCAGATCCAGTCCATCCCAACTCTGATGGTTTTCCGCGACGGCATCATG
GTCTACCGCGAAGCCGGCACCATGCCAGCTCCTGCACTGGATGATCTGGTCAACCAGGTTAAGGCACTCGACATGGATGACGT
TCGTGCGCCAGGTCGCAGAGCAGCAGGGTTCTGCAGAGGCA

RXN00937 - 3'-Region

TAAGCTTCCAATTGTGTTTTGGT

RXN00380 translatiert von RXN00380 (9027) von 1 bis 621

VRLTKLAATIGCVTL SGLALVACSSDSTAGTDAVAVGGTFQFHSPDGKMEIFYDEADRQQLPDIGGDSLMEEGTQINLSD
FENQVVILNAWGQWCAPCRSESDDLQIIHEELQAAGNGDTPGGTVLGINVRDYSRDIAQDFVTDNGLDYPSIYDPPFMTA
ASLGGVPASVIPTTIVLDKQHRPAAVFLREVTSKDVLDVALPLVDEA

RXN00380 - 5'-Region

CAGGCAATGCGACCTCGCCTCAGTGACATCCTTGGTGTTC AAGACGATCAAATTGTCGGCGTGCATTACAACGAACCAG
CTCAGGAGATTTGATCACTC

RXN00380 - kodierende Region

GTGCGTTTGACCAAAC TAGCAGCAACAATCGGCTGCGTGACACTCAGCGGACTTGCGCTAGTAGCCTGCAGCAGTGACAG
TACCGCTGGTACTGACGCTGTTGCTGTTCGGCGGAACCTTCCAATTCCACTCCCCGGATGGAAAGATGGAAATTTTCTACG
ACGAGGCTGACCGTCAACAAC TCCCGACATTGGTGGAGATTCCCTCATGGAAGAGGGCACACAGATCAACCTGTCTGAT
TTCGAAAACCAAGTTGTCATCCTCAATGCGTGGGGGCAGTGGTGTGCACCGTGCCGCTCCGAATCCGATGATCTCCAGAT
TATCCATGAGGAACTCCAAGCTGCCGGAACGGCGACACCCCTGGTGGCACCGTGTTGGGTATCAATGTGCGTGATTACT
CCCGCGACATCGCCCAAGACTTTGTCACCGACAACGGCCTTGATTACCCAAGCATTTACGATCCACCATTTATGACAGCA
GCATCCCTCGGTGGTGT TCCCGCATCGGTGATCCCAACCACCATCGTGCTGGATAAACAGCACCGCCCCGCAGCAGTGTT
CTTGCGCGAAGTCACCTCCAAGATGTGTTGGATGTTGCGTTGCCATTGGTAGATGAGGCC

RXN00380 - 3'-Region

TAAATGTCTGAGATTGTGGTAGC

RXN01676 translatiert von RXN01676 (7951) von 1 bis 756

MILHGVVVFYAGLLVLLVPLGLGAGILGELFITQRQTIIIVSSIVLIILGFVQIFGGGFDFGKALPGLDRLQSKATVTSGLGKS
FLLGMTSSIAGFCSGPILGAVLTLAATSGNSITSALILSAYGAGMVLPLMAIAALWAKLGQRGQQLRGREFTFLGRQWHIVS
VISGALIIAVGILFWSTNGLVSMPELVPMDTQIWLQEATFSLGSPLFDIALIIVAAGLFLYFWNKRQKRKEEAQRPKESGWVI
NPR

RXN01676 - 5'-Region

AGTTACAGCTTTTCTCGGTGGCACACTCGCGCTACTTAGCCCTTGTGCCGCACTCCTTTTACCAGCATTTTTTGCATCCTCAG
TGGGTGCTGGCCCCGCGC

RXN01676 - kodierende Region

ATGATCCTTCACGGTGTGTGTCTACGCAGGACTTCTAGTACTTCTCGTGCCACTTGGCCTTGGTGCGGGAATCCTCGGCGA
GCTGTTTATCACCCAACGCCAGACCATCATCGTGGTTTTTCATCGATCGTGCTGATTATCCTAGGTTTTGTCCAGATCTTCGGCG
GCGGATTCGACTTCGGAAAAGCACTCCCAGGATTAGATCGTCTGCAATCTAAGGCCACTGTGACCTCAGGTCTAGGAAAGAGC
TTTTTACTAGGAATGACCAGTAGTATTGCCGGTTTTTGTTCGGACCAATCCTCGGCGCCGTTCTTACTTTGGCTGCCACCAG
TGGAAACTCCATCACCTCAGCACTCATTTTGAGTGCTTATGGTGCGGGAATGGTGCTGCCCCCTGATGGCTATTGCAGCGCTCT
GGGCCAAACTCGGACAGCGTGGACAGCAGATGCTCCGCGGCCGGGAATTCACCTTCTTGGGCAGGCAGTGGCACATTGTTTCT
GTCATTAGCGGTGCCCTGATCATCGCTGTCGGAATCCTCTTTTGGTCCACGAACGGCCTTGTGAGCATGCCGGAGCTCGTTCC
AATGGACACCCAGATCTGGCTACAGGAAGCCACATTCTCACTCGGGTCACCACTCTTTGACATCGCATTGATCATTGTGCGCCG
CTGGCTTGTCTTGTACTTCTGGAACAAACGACAAAAGCGAAAAGAAGCTCAGCGACCCAAAGAAAGTGGATGGGTTATT
AACCCTCGC

RXN01676 - 3'-Region

TAATTATTAGTTTTGGAGCGAGG

RXN00833 translatiert von RXN00833 (7757) von 1 bis 495

MAKTHFQGNETATSGELPQVGDNLAEFNLVNTELGEVSSKDFQGRKLVNIFPSVDTGVCATSVRKFNAAAASLENTTVLCIS
KDLPPFALGRFCSAEGIENVTPVSAFRSTFGEDNGIVLEGSPLKGLLARSVIVVDENGKVAYTQLVDEIFTEPDYDAALAGLN

RXN00833 - 5'-Region

AGCTTTTTTGCATGTGTGCATATCGTACCGTTTGCATAGGCCTGTTTCGCGCTTGGTGAACCTTTTCTAGCACCAAAAACAAAACCTC
TCCCTAGTATGGGGTCC

RXN00833 - kodierende Region

ATGGCTAAAACACATTTTCAAGGCAACGAACTGCTACCTCCGGCGAACTGCCACAGGTCGGCGACAACCTCGCAGAGTTCAA
CCTCGTCAACACCGAACTGGGCGAGGTCTCCTCAAAGGACTTCCAGGGCCGCAAGCTTGTCTGAACATCTTCCCATCCGTTG
ACACCGGCGTTTGTGCAACATCAGTCCGCAAGTTCAACGAGGCAGCAGCAAGCCTGGAAAACACCACCGTGCTGTGCATCTCC
AAGGATCTTCCATTTCGCACTGGGCGGTTTCTGCTCCGCGAGAAGGCATCGAGAACGTCACCCCAGTATCCGCATTCCGTTCCAC
CTTCGGTGAAGACAACGGCATCGTGCTCGAAGGCTCACCCTTAAGGGTCTTCTTGACGCGAGCGTCATCGTCGTCGATGAAA
ACGGCAAGGTTGCTTACACCCAGTTGGTTGATGAGATCTTCACTGAACCTGATTACGACGCTGCACTTGCTGGGCTGAAC

RXN00833 - 3'-Region

TAATTTACTTCGCTCAGGGGAAT

RXN01863 translatiert von RXN01863 (1675) von 1 bis 1149

MNSVKLKQPVSIYNDPWESYNDVKEHGQLTSLNIEFTTTNLCNMRCSHCAVGYTTLQTVDPPEPLDMDLIYRRRLDEIPNLRTMSI
TGGEPMFSKKSIRNVVKPLLKYAHRGIYTMNSNLTLQDRYLDIAEYIDVMHISHNWGTTDEFANVGFGAMKKQPPLKAKL
KLYEQMISNARTLSEQGMFVSAETMLNQSTLPHLRKIHQEVVHDMKCSRHEIHPMYPADFASQLNVLTLAEMKKTIHDILDFR
DEDIWMLFGTLPVFPCLKDDEDQKLLSRLRNANNVTTRNDPDGRSRLNVNVFTGNVIVTDFGDETGTISNIQDKLTDVFDKW
LSSDLAKSLNCHCSEFSCLGPNVLVKNMYYPNMDFKDNERHMHKQPQIIQF

RXN01863 - 5'-Region

GGTATCATACCGATATGAACCAAATAGAAAGAAGGAAGTTTAAGACG

RXN01863 - kodierende Region

ATGAATAGCGTCAAATTGAAGCAACCTGTTAGCATTTACAATGATCCATGGGAATCATATAACGATGTTAAAGAACATGGCCA
ATTAACCTTTAAGTAACATCGAATTTACAACCTACAAATCTTTGTAATATGCGTTGTAGCCACTGTGCAGTTGGTTTACTTTAC
AAACTGTGACCCCGAGCCTTTAGATATGGACTTAATTTATCGTAGACTTGATGAAATTCCAAATCTGCGAACGATGTCAATT
ACAGGTGGCGAACCAATGTTTTCTAAAAAGTCTATTAGAAATGTTGTTAAACCTCTATTAAAGTATGCACATCATCGAGGTAT
ATATACACAAATGAATTCAAACCTAACATTGCCTCAAGATCGTTATTTAGATATTGCTGAATATATCGATGTTATGCATATCT
CACATAACTGGGGAACCACTGATGAATTCGCAAATGTTGGCTTTGGCGCAATGAAGAAGCAACCACCGTTAAAGCTAAGTTA
AAATTATATGAACAAATGATTTGCAATGCACGTACATTATCAGAACAAGGAATGTTTGTATCTGCGGAAACAATGCTCAATCA
AAGTACGCTACCACATTTACGAAAAATACATCAAGAAGTCGTTTCATGATATGAAATGTAGCAGACACGAGATTCACCCCTATGT
ATCCAGCTGACTTTGCAAGTCAATTAAATGTGTTAACTCTAGCGGAAATGAAAAAGACAATTCATGATATATTGGATTTTACA
GATGAAGATATTTGGATGTTATTTGGTACTTTGCCTGTGTTTCCATGCTTAAAGGATGATGAAGATCAAAAGTTACTATCACG
TTTAAGAAATGCTAACAATGTAACGACTAGAAATGACCCGGATGGCCGTAGTCGTTTAAATGTCAATGTATTTACAGGTAATG
TAATCGTAACTGATTTTCGGAGATGAAACAGGTACAATTTGCAATATACAAAAAGATAAATTAACAGATGTATTTGATAAATGG
TTATCCTCTGATCTTGCTAAATCATTAATTTGTCATTGTTCCGAGTTTAGTTGTTTAGGACCAAATGTTCTTGTAAAAATAT
GTACTATCCGAATATGGATTTTAAAGATAATGAGCGTCATATGCACAAACAACCACAAATTATACAATTT

RXN01863 - 3'-Region

TAAAAACTCTTAATTATGCGGAG

RXN00046 translatiert von RXN00046 (4489) von 1 bis 696

MDLNTQRSKLYAQLQGQLIVSVQAPDGHAMRDTHLTHVAAACVDGGAPAIRCGGYGGLEDIRSI SNRVDVPVFGLTKEGSEG
VYITPTRDSVRAVAESGATVVCADATFRPRPDGSTFAELVTVAHDSGILIMADCATPEEVLSAHKAGAD FVSTTLAGYTEHRE
KTVGPDFDCLREARELVPDAFLIGEFRFSNPADVAHGRLIGANAIIVGTAITDPGFITGQFASLLH

RXN00046 - 5'-Region

TGGTGCCCAAGCAGCCGTCATCGCAGCAGCAAAATATGCCCGCGATAACGCCTTTTAAGCACCTAAAACGCTGTTCTCAACAC
AGGAGTTTCCTTAAATA

RXN00046 - kodierende Region

ATGGACTTAAATACTCAACGCTCAAAGCTCTACGCACAGCTTCAAGGCCAGCTCATTGTTTCCGTGCAAGCTCCCGACGGCCA
TGCCATGCGAGATACCCATACGCTCACCCTGTGGCCGCGAGCCTGTGTGCGATGGCGGTGCTCCTGCCATTGCTGTGGCGGTT
ACGGCGGTTTGGGAAGATATCCGTTCAATCTCCAACCGTGTGCGACGTTCCCGTTTTTCGGACTCACCAAAGAAGGCTCCGAAGGA
GTTTACATCACCCCAACCAGGGATTCCGTTGAGCAGTGGCAGAAATCCGGCGCCACTGTAGTCTGCGCGGATGCAACTTTCGG
ACCTAGGCCTGACGGCTCCACCTTTGCAGAGCTGGTCACTGTTGCCACGATTCCGGAATTCTCATCATGGCGGACTGCGCAA
CTCCCGAAGAAGTTCTCAGTGGCATAAGGCTGGCGCGGATTTTGTGTCCACCACGCTTGCTGGATACACCGAACACCGCGAG
AAAACAGTCGGTCCAGATTTTCGATTGCCTCCGCGAAGCACGTGAGTTAGTTCCCGATGCGTTCCTCATTGGCGAAGGTCGCTT
CTCCAACCTGCGGATGTGGCGCACGGTCGTCTCATTGGTGCCAACGCGATCATCGTGGGCACCGCAATCACTGACCCTGGTT
TCATCACTGGACAGTTCGCGTCACTGTTGCAC

RXN00046 - 3'-Region

TAGCACTTAGTCCAGCGCTGCAC

RXN01559 translatiert von RXN01559 (3150) von 1 bis 1842

VLIVVG VYALVLLTGDRSATPKLGIDLQGGTRVTLVPQGQDPTQDQLNQARTILENRVNGMGVSGASVVADGNTLVITVPGEN
TAQAQSLGQTSQLLFRPVGQAGMPDMTTLMPELEEMANRWVEYGVITEEQANASLEEMNTAVASTTAVEGEEATEPEPVTVSA
TPMDEPANSIEATQRRQEITDMLRTDRQSTDPTVQIAASSLMQCTTDEMDPLAGTDDPRLPLVACDPAVGGVYVLDPAPLLNG
ETDEENGARLTGNEIDTNRPITGGFNAQSGQMEISFAFKSGDGEESATWSSSLTSQYLQQQIAITLDSQVISAPVIQSATPVG
SATSITGDFQTQEAQDLANNLRYGALPLSFAGENGERRGGTTTTVPPSLGAASLKAGLIAGIVGIALVAIFVFAYYRVFGFVSL
FTLFAAGVLVYGLLVLLGRWIGYSLDLAGIAGLIIGIGTTADSFVVFYERIKDEIREGRSFRSAVPRAWESAKRTIVTGNMVT
LLGAIVIIYLLAVGEVKGFAFTLGLTTVFDLVVTFLITAPLVILASRNPFPAKSSVNGMGRVMKLVEERRANGELDEPEYLLKKI
HAKNAAADKASTDNSSTDNSEAPGTDNQEEEK

RXN01559 - 5'-Region

GTCTGGTTGATTGGAATTGAAGGAGACTTTCTTGGCTCGGCAAAAAAGAGTGCCGCTAGCGCCTGGGAACGATGGCCAAAAC
CGCAATAGCGTTGTTT

RXN01559 - kodierende Region

GTGCTCATCGTCGTTGGTGTTTATGCGTTGGTGCTGTTGACAGGCGATCGTTCTGCCACACCAAAATTGGGTATTGATCTGCA
AGGCGGAACCCGAGTGACCCTCGTGCCGCAGGGGCAGGATCCAACTCAGGACCAGCTGAATCAGGCACGCACCATTCTGGAAA
ACCGTGTTGAACGGCATGGGCGTTTCAGGTGCAAGCGTGGTTCGCTGACGGTAACACGCTGGTGATCACTGTTCCCGGGGAAAAT
ACCGCACAGGCGCAATCCCTAGGACAGACCTCCCAGCTGCTGTTCCGTCCTGGTCAGGCAGGAATGCCCGATATGACCAC
GTTGATGCCAGAGCTGGAAGAGATGGCCAACAGGTGGGTTGAATACGGCGTCATCACCAGAGCAGGCAAATGCCTCCTTGG
AGGAAATGAACACCGCTGTTGCATCGACCACTGCGGTGGAAGGCGAAGAAGCAACTGAGCCAGAACCCGTCACCGTGTCGGCG
CCCCCTATGGATGAGCCAGCCAACCTCCATTGAGGCAACACAGCGACGCCAGGAAATCACGGACATGCTGCGCACCCGACCGCCA
GTCCACCGATCCCCTGTCCAGATCGCTGCAAGTTCTTTGATGCAGTGCACTGATGAGATGGATCCTTTGGCCGGCACCG
ATGATCCACGCCTGCCATTGGTGGCATGTGATCCAGCTGTAGGTGGCGTGTATGTACTTGATCCTGCACCTTTGCTCAACGGC
GAAACCGATGAGGAAAATGGTGCGCGCCTAACC GGTAATGAGATCGATACCAACCGTCCCATCACCGGTGGATTCAACGCCCA
GTCCGGCCAGATGGAAATCAGCTTTGCCCTTCAAATCCGGCGATGGGGAAAGAAGGCTCTGCAACTTGGTCCTCTCTGACCAGCC
AGTACCTGCAGCAGCAGATCGCCATCACCTGGACTCTCAGGTGATTTCTGCACCCGTGATTCACTCAGCAACCCCTGTGGGT
TCTGCAACATCCATCACCGGTGACTTCACTCAAATGAAGCCCAAGATCTGGCGAACAACCTGCGCTACGGTGCAATTGCCCCCT
GAGCTTCGCAGGTGAAAACGGCGAGCGCGGCGGAACCTACCACCACCGTTCCGCCATCACTAGGCGCAGCATCCTTGAAGGCCG
GACTGATCGCAGGCATCGTCGGCATCGCGCTGGTTCGCCATCTTCGTGTTTCGCTACTACCGCGTCTTCGGATTCGTTTCCCTG
TTCACCCTGTTTGGCCGAGGCGTGTGGTCTACGGCCTTCTGGTACTGCTGGGACGCTGGATCGGATATTCCCTAGACCTTGC
TGGTATCGCCGGTTTGATCATCGGTATCGGTACCACCGCCGACTCCTTCGTGGTGTCTATGAGCGCATCAAGGATGAGATCC
GTGAAGGAAGATCCTTTAGATCTGCAGTACCTCGTGCATGGGAAAGCGCCAAGCGCACCATCGTCACAGGCAACATGGTCACT
TTGCTCGGCGCTATCGTGATTTACTTGCTCGCGGTGCGCGAAGTCAAGGGCTTTGCCTTACCCTGGGTCTGACCACCGTATT
CGATCTCGTTGTACCTTCTGATCACGGCACCACTGGTTATCCTGGCATCACGCAACCCATTCTTTGCCAAGTCATCGGTCA
ACGGCATGGGACGAGTGATGAAGCTCGTTGAAGAAGCGCGCCAACGGTGAATTGGATGAGCCTGAGTACCTGAAAAAGATC
CATGCCAAGAATGCGGCAGCTGATAAGGCTTCCACTGACAATTCTTCCACTGACAATTCTGAAGCACCTGGCACCGATACGAA
CCAAGAGGAGGAGAAG

RXN01559 - 3'-Region

TAGCCATGACTGATTCCCAGACT

RXN02462 translatiert von RXN02462 (3189) von 1 bis 1818

MTKDVHYEVDERKKTVGVKKEEGVEYVEDQLGIDNLYAPEHSQVLVSYLNNAIKAQELFTRDKDYIVRNGEVMIVDGFTGRVLG
RRYNEGMHQAIEAKERVEIKNENQTLATVTLQNYFRLYTKLAGMTGTAETEAELNQIYKLDVIAIPTNRPNQREDLTDLVYK
TQEAKFAAVVDDIAERTEKGQPVLVGTVSVERSEYLSQLLTKRGIKHNVLNAKHHEQEAQIVAQAGLPGAVTVATNMAGRGT
IVLGGNPEILLDIKLRLRGLDPFEDEESYQEAWDAELPAMKQRCERGDVREAGGLYVLGTERHESRRIDNQLRGRSARQGD
PGSTRFYLSMRDDLMLVRFVGPMTENMMNRLNVPDDVPIESKTVTNSIKGAQAQVENQNFEMRKNVLKYDEVMMNEQRKVIYSE
REILESADISRYIQNMIEETVSAYVDGATANGYVEDWDLKLWNALEALYDPSINWTDLVEGSEYGKPGELSAEDLRALVND
AHAEYAKLEEAVSAIGGEAQIRNIERMVLMFVIDTKWREHLYEMDYLKEGIGLRAMAQRDPLVEYQKEGGDMFNGMKDGIKEE
TVRQLFLSASSSSSKTRKSLTNSEP

RXN02462 - 5'-Region

TCCATCCTCATCGACGAAGCCCGCACCCCACTGATTATCTCCGGGACCAGTAGACGGCACATCGCAGTTCTACAACGTCTTCG
CACAGATCGTCCCACGC

RXN02462 - kodierende Region

ATGACCAAGGACGTTCACTACGAAGTCGACGAACGTAAGAACGCGTCGGTGTGAAAGAAGAAGGCGTCGAATACGTCAAGA
CCAACTCGGCATCGACAACCTCTACGCACCTGAGCACTCACAGCTGGTCAGCTACCTGAACAACGCCATCAAGGCACAGGAAC
TGTTACCCGCGACAAGGACTACATCGTCCGCAACGGCGAAGTTATGATCGTCGACGGCTTCACCGGCCGTGTCTTGGCGGC
CGCCGATACAACGAAGGCATGCACCAGGCGATCGAAGCCAAAGAGCGCGTAGAGATCAAAAACGAGAACCAGACCCTGGCGAC
CGTTACCCTCCAGAACTACTTCCGCCTCTACACCAAACCTCGCCGGCATGACCGGTACCGCAGAGACCGAAGCAGCAGAGCTCA
ACCAGATCTACAAGCTCGACGTCATCGCGATCCCAACCAACCGACCAAAACGAGCGCGAAGACTTGACCGACTTGGTGTACAAA
CCCAAGAGGCTAAGTTCGCGAGCAGTCGTCGACGACATCGCAGAACGCACCGAAAAGGGCCAACAGTCCTCGTCGGTACCGT
CTCCGTGCGAGCGCTCCGAATACCTCTCCCAGCTGTTGACCAAACGAGGCATCAAGCACACGTCCTCAATGCGAAGCACCACG
AGCAGGAAGCACAGATCGTTGCTCAGGCAGGTCTTCCAGGCGCCGTCACCGTTGCCACCAACATGGCGGGCCGTGGAACCGAC
ATCGTGCTCGGCGGAAACCCAGAAATCCTCCTCGACATCAAACCTCCGCGAACGTGGACTTGATCCTTTGAAAGACGAAGAAAG
CTACCAGGAAGCCTGGGACGCTGAACTTCCAGCAATGAAGCAGCGATGCGAAGAAGCTGGCGACAAAGTCCGCGAAGCCGGAG
GACTCTACGTCCTTGGCACCGAACGCCACGAATCCCGACGCATCGACAACCAGCTGCGCGGTGCTTCTGCACGTCAGGGCGAC
CCAGGATCCACCCGCTTCTATCTCTCTATGCGCGACGACCTGATGGTTCGCTTCGTCGGCCCAACCATGGAAAACATGATGAA
CAGGCTCAACGTCCCAGACGATGTGCCATCGAATCCAAAACCGTCACCAACTCCATCAAGGGCGCCCAAGCTCAGGTGGAGA
ACCAGAACTTCGAAATGCGTAAGAACGTTCTGAAGTACGACGAAGTCATGAACGAACAGCGCAAGGTTATCTACAGCGAGCGA
CGCGAAATCCTCGAATCCGCGAGACATCTCCCGCTACATCCAAAACATGATCGAAGAAACAGTCAGCGCATACGTGACGGCGC
CACCGCCAACGGCTACGTGGAAGACTGGGACCTCGACAAACTCTGGAACGCCCTCGAAGCCCTCTACGACCCATCGATCAACT
GGACCGACCTCGTCGAAGGCAGCGAATACGGCAAACAGGGGAGCTGTCCGCCGAAGATCTACGCACCGCACTCGTCAACGAC
GCCCACGCCGAATACGCAAAACTCGAAGAAGCCGTATCCGCAATCGGCCGGCGAAGCACAGATCCGCAACATCGAACGAATGGT
GCTCATGCCAGTCATCGACACCAAATGGCGCGAACACCTCTACGAAATGGACTACCTGAAAGAAGGCATCGGCCTGCGCGCAA
TGGCACAGCGCGACCCACTGGTCAATACCAAAGGAAGGCGCGACATGTTCAACGGCATGAAAGACGGCATCAAGGAAGAA
ACCGTCCGCCAGCTCTTCTCTCCGCAAGCAGTTCATCAAGCAAGACGCGGAAGTCGCTGACTAACTCAGAACC

RXN02462 - 3'-Region

TGAAATTCAGCATCCGCCACATG

RXN02949 translatiert von RXN02949 (1467) von 1 bis 333

VSDEQNSGVGGTSRPTGKRQLSGASTTSTSSYEAKQVSTQKKSSGSDSKPGGGVISFLPEVVGEVRKVIWPTARQMVTYTLVV
LGFLIVLTALVSGVDFLAGLGVEKILTP

RXN02949 - 5'-Region

ACTCTCGAAGGTTGAACACAGGGCTGCGATTGTGCTGGATCAAATGTCTGCACGAAAAATTGTTATCGCCCCCTGGATGAGTAG
TGATTTAGAGGAGTGCT

RXN02949 - kodierende Region

GTGAGCGACGAGCAGAATTCTGGCGTAGGCGGAACGTCTCGCCCAACGGGTAAACGCCAGCTGTCGGGTGCTTCCACTACCTC
TACCTCTTCTTATGAGGCTAAGCAGGTATCTACACAGAAGAAGTCATCCGGTTCGGATTCTAAGCCTGGCGGCGGTGTTATTT
CTTTTCTGCCTGAGGTTGTGGGAGAAGTCCGTAAGGTTATTTGGCCTACTGCGCGCCAGATGGTCACGTACACCCTTGTGCTT
TTGGGATTCTTGATTGTTTTGACCGCTTTGGTGTCTGGTGTGGATTTCTAGCTGGTCTTGGAGTTGAGAAGATTCTGACTCC
G

RXN02949 - 3'-Region

TAGGTAGGATGTGTAACATCTTT

RXN03054 translatiert von RXN03054 (8742) von 1 bis 1581

MKLFSKAAGVIAAALLVAGGIAPVAQGGQASQVVTPEQDAYVQQFHHEGNTPPVVDGVGGYTEQEIAEIHAEIRQAQESGAPN
EELIPGEMWSDKVELPVTIDKAAADEAEIAIAQQQSQPQTRGLAAAAACQTFWPSPHQVCGAILERYIQQGAQFGWMLFPSEG
QTLNPDGQGYRQRFMNGFVYWHPTTGAHAVNNYSAQVWERNGWESGWMGYPTGGEVPVNGSNPIDGELSGWVQTFQGGRVYRS
PVLDFGFQVASINGLILDKWLELGGPDSLDLGFPIADEAVTADGVGRFSVFQNGVVYWHPPQHGAPILGNIYSIWREEGAESGEF
GYPIGDPEKYTENMANQVFEKGELAAANLYPNPLEAFIEFLPFANLEEAIEYFENGLSNSRVEANSNLAKKDSIQCSQSANIH
VRTKSDGVGIRVPKIGFKARMDCDLPGTVSDVVGYGWIYYDYWGRWAQAAQAQFFGNRNSVVQTNLEAGCSGEKNTLFWGTS
YFQVTYEQPYFGQSATNYAYLPCTIDRS

RXN03054 - 5'-Region

GGTGGAAATACGCGCACAAACATTTTATTACAGAACTTATGATTTTTTCGGGTTAGGGTCAGTTTGTTCACATCAACTAGTA
ACGAAAGGATCATGTGA

RXN03054 - kodierende Region

ATGAAACTGTTTTCCAAGGCTGCAGGCGTCATTGCTGCAGCACTTCTTGTTCAGGTGGTATAGCACCTGTGGCACAGGGGCA
AGCTAGTCAGGTGGTCACACCTGAAGACCAAGATGCGTATGTTCAACAGTTCACCACGAAGGGAATACCCACCTGTGGTAG
ACGGGGTGGGTGGCTACACTGAGCAAGAAATCGCCGAGATCCACGAGGCTATCCGACAAGCCCAAGAATCTGGCGCACCTAAT
GAAGAGCTCATTCCGGGTGAGATGTGGTCAGATAAGGTGGAGCTGCCAGTAACATTGATAAAGCAGCCGCTGATGAGGCAGA
GATAGCTATTGCACAGCAACAATCTCAGCCACAGACGCGAGGCCCTTGCTGCGGCTGCGGCGTGTGACACGTTTTGGCCGTCAC
CTCATCAGGTTTGTGGTGCTATTTTAGAGCGCTATATTCAGCAGGGTGCCAGTTTGGGTGGATGTTGTTTTCCGAGTGAAGGC
CAAACGTTAAATCCTGATGGTCAGGGGTATCGTCAGCGGTTTATGAATGGGTTTGTATTGTCATCCGACAACCTGGTGCGCA
GCTGTTAATAATTACAGTGCGCAGGTGTGGGAGCGTAATGGGTGGGAGTCTGGGTGGATGGGTTATCCCACTGGTGGTGAAG
TCCCTGTGAATGGTTCCAATCCGATTGATGGTGAGTTGAGTGGGTGGGTGCAAACTTTCCAAGGTGGGCGAGTGTATCGCAGT
CCGGTATTGGACGGTTTCCAGGTGGCCAGTATTAATGGGCTGATCTTGGATAAATGGCTTGAATTGGGTGGTCCCTGATAGTGA
CCTTGGTTTTTCCCATTCGCGATGAGGCTGTGACAGCTGACGGTGTGGGTAGATTTTCTGTTTTCCAGAACGGAGTTGTCTACT
GGCATCCGCAACACGGAGCTCACCCATATATTAGGGAATATATACAGTATCTGGAGAGAAGAAGGAGCTGAGAGTGGGGAATTC
GGTTACCCTATCGGCGATCCAGAAAAGTATACAGAAAACATGGCTAATCAGGTATTCGAAAAAGGCGAACTTGCAGCTAACCT
ATACCCCAATCCTCTTGAGGCTTTTATTGAGTTTTTACCCCTTGCTAATCTTGAGGAAGCAATAGAGTATTTTGAGAACGGAT
TGTCAAATTCTCGTGTAGAGGCGAATTCACCTAACGCCAAGAAAGATTGATTCAATGTCAATCGCAATCCGCTAACATTCAT
GTGAGAACGAAGAGTGACGGAGTCGGGATTAGGGTTCCAAAGATTGGGTTTAAGGCTAGGATTGCGACCTTCTTGGAAC
TGTCTCAGATGTAGTGGGGTATGGATGGATTTACTACGACTATTGGGGACGATGGGCTCAAGCAGCATATGCACAACAATTCT
TCGGTAATAGGAATTCTGTTGTGCAAACCAATTTAGAGGCGGGTGCAGCGGGGAGAAGAATACATTATTTTGGGGTACTTCA
TATTTTCAGGTGACTTATGAAGGTCAGCCGATTTTCGGTCAGTCAGCAACTAATTACGCTTATCTTCCGTGTACGATAGACCG
TAGT

RXN03054 - 3'-Region

TAACATAAGGAATGGAATAGGAG

RXN03051 translatiert von RXN03051 (1794) von 1 bis 735

MRSDVIELPEGVSKEKADQLEVAEARLNEGARLMATTGCEVMWPTGFSVCGRILD TYRQVGGQLSWLGPPKSNELTNP DGVGK
RSEFFGGAIYWHPD TGAYAVTLDGLRQWGTLNWESGPLGYPTSGPMDTNYPLTQRQTFQGGDNYYNPLTGGAVWGD IKQRYEE
LGGSNHAIGIPITNELPSGTEYFYNNFSNGTISWRNDRQTRFMYLATQRVWDALGRETGRLGFPEADETPEVSGLFHVA

RXN03051 - 5'-Region

ACATCCAGAAGTAGTCGTTGAGTATCACGAGCAAGTCAACGATAGTAAAGATAATGTCGAGGAAC TCCCGCTGCCTAAGCGGG
ACATAGTTGCAGGGGAC

RXN03051 - kodierende Region

ATGCGTTCAGATGTTATCGAGTTACCGGAGGGGGTAAGCAAGGAGAAAGCTGACCAGCTAGAAAGTTGCGGAAGCGCGACTTAA
CGAGGGGTGCACGACTGATGGCAACCACCGGGTGTGAGGTTATGTGGCCAACGGGCTTCTCAGTTTGTGGCCGAATTCCTTGACA
CCTATCGCCAGGTTGGAGGTCAGTTGTTCATGGCTTGGGCCACCGAAGTCAAACGAGTTGACCAATCCCGACGGTGTTGGCAAA
AGAAGTGAATTTTTTGGTGGAGCCATCTATTGGCACCCAGACACAGGCGCTTATGCAGTGACCTTGGACGGTTTGCGACAGTG
GGGGACCTTGAAGTGGGAATCAGGGCCATTGGGGTACCCAACCTCTGGTCCGATGGATACAAACTATCCCCCTTACTCAGCGAC
AGACTTTTCAAGGTGGTGACAAC TACTACAACCCATTGACTGGCGGTGCTGTGTGGGGCGATATTAAACAGCGCTACGAAGAA
CTTGGCGGCTCGAATCATGCCATTGGCATCCCGATCACTAATGAGCTACCTAGCGGTACTGAGTATTTTTACAATAATTTCTC
CAATGGAACAATTTTCGTGGCGAAATGATCGTCAGACACGGTTTATGTATTTGGCTACGCAGCGGGTGTGGGATGCGTTGGGTC
GGGAGACGGGTCGTTTAGGTTTTCTGAAGCAGATGAAACACCTGAGGTTTCTGGTCTATTCCATGTGGCG

RXN03040 translatiert von RXN03040 (6898) von 1 bis 309

MSXGDNAPIDEDAFKNRVLVGFEIEAMSNTCTHNLKAATDQMGIDNINYDFRPTGTHAWDYWNEALHRFFPLMMQGFGLDGGP
IPIYNPNGVTSSSESSXRTVF

RXN03040 - 5'-Region

ATTACTCTCGCTATAACGATCCTTNTGCTCAACGCTGCGAAGCTCGAAGAACAAGACAACCTCTACATCTTCGCCGGTTCCGG
TGTGTTCTCTGAACTAG

RXN03040 - kodierende Region

ATGTCATNCGGTGACAACGCACCGATTGATGAGGATGCGTTCAAAAACCGCGTCTTGGTTGGGTTTGAAATCGAAGCTATGTC
CAACACCTGCACCCATAACCTCAAGGCTGCGACCGATCAAATGGGCATCGACAACATCAACTACGATTTCCGACCAACCGGAA
CCCACGCCTGGGATTACTGGAACGAAGCGCTCCACCGCTTCTTCCCGTTGATGATGCAGGGCTTCGGCCTCGACGGTGGTCCC
ATCCCGATCTATAACCCCTAACGGTGTGACCTCCAGCGAGTCTTCTNTCAGAACTGTCTTC

RXN03040 - 3'-Region

TGATGTGAGCCTTGGCACCNGTG

RXN03039 translatiert von RXN03039 (1469) von 1 bis 630

ALPQYTDPRYPPLGKDDLPAKATIDMEPEALARLERFVGVDGRIRQINAYSPSMGRITPLVWVVPEDNTVPGPTVYALGGG
DGGQGGQNWVTRTDLDLDELTSENNINLIMPMLGSFSFYADWAGESESMGGAQQWETFLMHELPEPLEAAIGADGQRSIVGM
SMSGGSVLNFATHDPNIFYSSVGSFSGCAETNSWMGRRWHRSHCLQRQCRA

RXN03039 - kodierende Region

GCACTCCCGCAATACACCGACCCACGCTACCCCTCGGCAAAGACGACCTGCCCCAAAGCAACCATCGACATGGAGCCAGA
AGCTCTTGCGCGCCTTGAGCGATTCTGTCGGCGTTGACGGTGATCGCATCCGCCAAATCAACGCGTACTCGCCATCAATGG
GACGCACCATTCCTCTAGTCTGGGTCGTGCCAGAAGACAACACCGTGCCTGGCCCAACGGTCTACGCACTCGGCGGCGGC
GACGGTGGCCAAGGCGGCCAAAACCTGGGTCACCCGCACCGACCTTGATGAGTTGACCAGTGAAAACAACATCAACCTCAT
CATGCCCATGCTCGGATCTTTTAGTTTCTACGCTGACTGGGCAGGCGAAAGCGAATCCATGGGTGGTGCGCAACAGTGGG
AAACATTCTCATGCACGAACRCCMGAGCCGCTAGAAGCGGCCATCGGCGCAGACGGGCAACGCAGCATCGTCGGCATG
TCCATGTCCGGGGGATCRGTGCTGAACTTTGCGACGCATGACCCCAACTTTTAYTCCTCKGTCGGCTCATTTTCTGGATG
TGCCGAAACCAACTCCTGGATGGGRCGCCGNTGGCATCGCAGCCACTGCCTACAACGGCAATGTCGTGCC

RXN03039 - 3'-Region

TGAGCAAATCTTTGGTGAAGTAG

RXN03038 translatiert von RXN03038 (812) von 1 bis 726

MHSKEELTVRKGISRVLSVAVASSIGFGTVLTGTGIAAAQDSAFDYGMDPNMNYNPIDDIKDRPEGLSNLPYFGSKLTSWGSS
YATASSGVVTSALPQYTDPRYPLGKDDL PKATIDMEPEVLARLERFVGVDGDRIRQINAYSPSMGRTIPLVWVVPEDNTVPGP
TVYALGGGDGGQGGQNWVTRTDLEELTSDNNINLIMPMLGSFSFYSDWARESQSMGCAQQWETLLMHHELPEPLVAA

RXN03038 - 5'-Region

GCGCGGAAAACACCAAGTAAGCCTTACAGTCCGACAGCCTCATAGCGGATGGGATAAGTTCCAAACACGTTCAAATCCGTAA
AGTGCCTGTTTAAACT

RXN03038 - kodierende Region

ATGCATTCAAAGGAAGAGTTAACAGTGCGTAAAGGAATTTCCCGCGTCCTCTCGGTAGCGGTTGCTAGTTCAATCGGATTCGG
AACTGTACTGACAGGCACCGGCATCGCAGCAGCTCAAGACTCTGCATTTGACTACGGTATGGATCCAAACATGAACTACAACC
CGATCGATGACATCAAGGATCGTCCCGAAGGATTGTCCAATCTTCCCTACTTCGGAAGTAAATTGACCAGCTGGGGCTCATCA
TATGCCACCGCCTCATCCGGCGTCGTGACCTCCGCGCTCCCGCAGTACACCGATCCGCGCTACCCCTCGGGCAAAGACGACCT
GCCCAAGGCAACCATCGACATGGAGCCAGAAGTTCTTGCGCGCCTTGAGCGATTTCGTGCGCGTTGACGGTGATCGCATCCGCC
AAATCAACGCGTACTCGCCATCAATGGGACGCACCATTCCTCTAGTCTGGGTTGTTCCAGAAGACAACACCGTGCTTGCCCA
ACGGTCTACGCACTCGGAGGCGGTGACGGTGGACAAGGCGGCCAGAACTGGGTCACCCGCACCGACCTTGAGGAATTAACCAG
TGACAACAACATCAACCTCATCATGCCGATGCTCGGATCTTTTAGTTTCTACTCTGACTGGGCACGCGAAAGCCAATCCATGG
GTTGTGCGCAACAGTGGGAAACATTGCTCATGCACGAACTGCCTGAGCCGCTTGTTAGCGGCC

CODIERENDE GENE VON *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* FÜR AN DER
GENTISCHEN STABILITÄT, GENEXPRESSION UND DER PROTEINSEKRETION
UND -FALTUNG BETEILIGTE PROTEINE

5

Zusammenfassung der Offenbarung

Isolierte Nukleinsäuremoleküle, die als SES-Nukleinsäuremoleküle
bezeichnet werden und neue SES-Proteine aus *Corynebacterium glu-*
10 *tamicum* codieren, werden beschrieben. Die Erfindung stellt zudem
Antisense-Nukleinsäuremoleküle, rekombinante Expressionsvektoren,
die SES-Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, in die
die Expressionsvektoren eingebracht worden sind, bereit. Sie
stellt weiterhin isolierte SES-Proteine, mutierte SES-Proteine,
15 Fusionsproteine, antigene Peptide und Verfahren zur Verbesserung
der Produktion einer gewünschten Verbindung aus *C. glutamicum* be-
reit, die auf der genetischen Manipulation von SES-Genen in die-
sem Organismus beruhen.

20

25

30

35

40

45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.